

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 915**

51 Int. Cl.:

A61P 1/14 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C12R 1/245 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/EP2016/080449**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17097984**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16820182 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3387156**

54 Título: **Lactobacillus casei para el tratamiento de la obesidad y los trastornos metabólico
sasociados**

30 Prioridad:

11.12.2015 EP 15199657

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.02.2021

73 Titular/es:

**PRECISIONBIOTICS GROUP LIMITED (100.0%)
Building 4400, Cork Airport Business Park,
Kinsale Road
Cork T12 N84F , IE**

72 Inventor/es:

**KIELY, BARRY;
MURPHY, EILEEN FRANCES y
HEALY, SELENA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 807 915 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Lactobacillus casei para el tratamiento de la obesidad y los trastornos metabólicos asociados

5 **Introducción**

La invención se refiere a una cepa de *Lactobacillus casei*.

10 La obesidad es uno de los desafíos de salud pública más serios del siglo XXI. A nivel mundial, aproximadamente el 13 % de los adultos son obesos y otro 39 % se considera con sobrepeso (OMS, 2015). La obesidad es un trastorno multifactorial que es el resultado de un desequilibrio a largo plazo entre la ingesta y el gasto de energía y está influido por factores genéticos y ambientales. La obesidad se caracteriza por la resistencia a la insulina y una inflamación crónica de grado bajo (Gregor y Hotamisligil, 2011, Kahn *et al.*, 2006). La interacción íntima entre el sistema inmunológico, el metabolismo y la microbiota intestinal puede desempeñar un papel importante en el control de la obesidad y la homeostasis metabólica. La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar y exacerbar un grupo de trastornos metabólicos crónicos tales como diabetes de tipo 2 (DMT2), enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), hipertensión, aterosclerosis, dislipidemia y enfermedad cardiovascular (Guh *et al.*, 2009) y la prevalencia de comorbilidades metabólicas aumenta de forma consistente con el aumento del IMC (Gupta *et al.*, 2015). La obesidad también aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades graves y potencialmente mortales, tales como 20 alergia y asma, artrosis, enfermedad de la vesícula biliar y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), una afección en la que la grasa se acumula en el hígado y la principal causa de cirrosis hepática.

El síndrome metabólico, una afección cada vez más común, se refiere a la combinación de obesidad, hiperlipidemia (niveles altos de triglicéridos), hipertensión (presión arterial alta) e intolerancia a la glucosa (niveles altos de azúcar en sangre) y niveles bajos de colesterol HDL. Estos factores de riesgo ayudan a identificar sujetos con alto riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2 (DT2) y enfermedad cardiovascular.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es un trastorno muy común y se refiere a un grupo de afecciones en las que hay acumulación de exceso de grasa en el hígado de las personas que beben poco o nada de alcohol.

La forma más grave de EHGNA se llama esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). La EHNA hace que el hígado se hinche y se dañe. La EHNA tiende a desarrollarse en personas con sobrepeso u obesidad, o que tienen diabetes, niveles altos de colesterol o niveles altos de triglicéridos.

Una gran cantidad de datos clínicos y experimentales muestra que un mayor flujo de ácidos grasos libres a partir del aumento del tejido adiposo visceral puede conducir a EHGNA relacionada con la resistencia a la insulina. Por lo tanto, los individuos con obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia tienen el mayor riesgo de desarrollar EHGNA.

40 Dado que se ha observado que los ratones libres de gérmenes eran más delgados que sus homólogos criados de forma convencional (Backhed *et al.*, 2004), la contribución de la microbiota intestinal al desarrollo de la obesidad se está investigando cada vez más (Backhed *et al.*, 2007, Cani *et al.*, 2008b, Ridaura *et al.*, 2013, Vrieze *et al.*, 2012). La contribución de la microbiota intestinal a la obesidad es multifactorial e implica cuestiones tales como la mejora de la recogida de energía y el almacenamiento de grasa (Turnbaugh *et al.*, 2006) las rutas metabólicas alteradas (Kotzampassi *et al.*, 2014, Turnbaugh *et al.*, 2009) y la translocación bacteriana que conduce a inflamación crónica de bajo grado (Cani *et al.*, 2007, Cani *et al.*, 2008a). Por lo tanto, la manipulación de la microbiota intestinal por los probióticos es una herramienta terapéutica potencial para ayudar a mejorar la obesidad y mejorar la salud metabólica. Las cepas de *Lactobacillus* se usan habitualmente como probióticos y tienen un cuerpo de evidencia que respalda los efectos beneficiosos para la salud *in vivo* de una manera específica de cepa (Aronsson *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2006, Naito *et al.*, 2011).

El mecanismo de acción de estas cepas no está bien caracterizado. Un grupo de moléculas que son de interés son los exopolisacáridos bacterianos (EPS). Los EPS son polímeros de alto peso molecular que están compuestos por residuos de azúcar y son secretados por bacterias en el ambiente circundante. Se ha demostrado que las bacterias productoras de exopolisacárido (EPS) tienen efectos inmunomoduladores (Fanning *et al.*, 2012, Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2014, Vinderola *et al.*, 2006, Volman *et al.*, 2008, Jones *et al.*, 2014). Muchas bacterias del ácido láctico (LAB) tienen la capacidad de sintetizar EPS. Sin embargo, los EPS son moléculas heterogéneas y difieren en la composición, la carga y la estructura molecular que pueden explicar la bioactividad específica de la cepa observada (Adams *et al.*, 2008, Bland *et al.*, 2004, Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2012, Kankainen *et al.*, 2009). La inflamación crónica de bajo grado asociada con la obesidad y los trastornos metabólicos (Gregor y Hotamisligil, 2011) es un factor de riesgo que podría ser objeto de manipulación mediante la administración de probióticos para influir favorablemente en el desarrollo de la obesidad. Anteriormente se ha demostrado que otra bacteria del ácido láctico, *B. longum* NCIMB41003, tiene efectos antiinflamatorios. Esta bacteria tiene una capa de EPS sustancial. El material EPS también tiene un efecto antiinflamatorio como se describe en el documento WO2010055499A.

El documento WO2015/172191A1 desvela composiciones para el tratamiento o prevención de la obesidad o un trastorno relacionado con la obesidad, las composiciones que comprenden dos o más cepas bacterianas probióticas seleccionadas entre *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis (*B. lactis*) y *Streptococcus thermophilus*.

El documento JP2009102270A informa sobre un inhibidor del metabolismo de las grasas que utiliza como principio activo el mutante de una cepa de *Lactobacillus paracasei* KW3110, o la cepa de *Lactobacillus paracasei* KW3110 y que tiene un efecto inhibidor del metabolismo de las grasas.

Sophie Holowacz *et al.*: "A multispecies Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing probiotic mixture attenuates body weight gain and insulin resistance after a short-term challenge with a high-fat diet in C57/BL6J mice", describe que el tratamiento con una mezcla probiótica de múltiples especies que comprende cinco cepas bacterianas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. salivarius* y dos cepas de *Bifidobacterium lactis*) podrían atenuar la obesidad experimental inducida en ratones por una dieta rica en grasas. Se concluyó que la suplementación específica con probióticos describía un aumento de peso corporal significativamente atenuado y protegía a los ratones de la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas.

Declaraciones de invención

La invención proporciona la cepa depositada NCIMB 42019. Una cepa de *Lactobacillus casei* AH077 depositada con el NCIMB con el número de registro 42019. El microorganismo produce un polisacárido y aumenta la excreción de energía.

La cepa de la invención puede usarse para reducir la acumulación de grasa corporal en un sujeto. La cepa puede tener la acción de bloquear la absorción de grasa desde el tracto intestinal. La cepa puede usarse para bloquear el aumento de peso o reducir el peso. La cepa puede usarse para el tratamiento, prevención o alivio de una afección resultante de la acumulación excesiva de grasa corporal.

La cepa es particularmente útil en la prevención o el tratamiento de la obesidad y el síndrome metabólico relacionado con la obesidad.

La cepa puede estar en forma de células viables. La cepa puede estar en forma de células no viables. El uso general de las bacterias probióticas es en forma de células viables. Sin embargo, el uso también puede extenderse a células no viables como los cultivos muertos, mezclas de cultivos o composiciones viables y no viables que contienen factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto podría incluir microorganismos térmicamente muertos o microorganismos muertos por exposición a pH alterado o por exposición a presión o irradiación gamma. Con células no viables, la preparación del producto es más simple, las células pueden incorporarse fácilmente en productos farmacéuticos y los requisitos de almacenamiento son mucho menos limitados que los de las células viables. *Lactobacillus casei* YIT 9018 ofrece un ejemplo del uso efectivo de células muertas con calor como método para el tratamiento y/o prevención del crecimiento tumoral como se describe en la patente de Estados Unidos n.º US4347240.

La invención también proporciona una formulación que comprende una cepa como se describe en el presente documento. La formulación puede comprender además un material probiótico. La formulación puede comprender además un material prebiótico. La formulación puede comprender además un vehículo ingerible. El vehículo ingerible puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una cápsula, comprimido o polvo. El vehículo ingerible puede ser un producto alimenticio, tal como leche acidificada, yogur, yogur congelado, leche en polvo, concentrado de leche, queso para untar, aderezos o bebidas. La formulación puede comprender además una proteína y/o péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, un mineral y/o un oligoelemento. La cepa de *Bifidobacterium* puede estar presente en una cantidad de más de 10^6 ufc por gramo de la formulación. La formulación puede comprender además un adyuvante. La formulación puede comprender además un componente bacteriano. La formulación puede comprender además una entidad farmacológica. La formulación puede comprender además un compuesto biológico. La formulación puede usarse para protocolos de inmunización y vacunación.

La invención también proporciona una composición liofilizada que comprende una cepa de la invención o una formulación de la invención.

La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para su uso en productos alimenticios.

La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para su uso como medicamento. La invención también proporciona una cápsula que comprende una cepa o una formulación de la invención.

La composición, tal como una cápsula, puede adaptarse para liberación controlada en el tracto gastrointestinal.

La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas.

5 La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).

10 Las cepas como se describen en el presente documento pueden usarse en la preparación de un panel de agentes bioterapéuticos para modificar los niveles de IL-10.

También se describe una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de la inflamación relacionada con la obesidad.

15 La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de la regulación metabólica alterada relacionada con la obesidad.

20 También se describe un método para bloquear la absorción de grasa, que comprende administrar una composición que comprende una cepa depositada con el NCIMB con el número de registro NCIMB 42019 a un sujeto que necesita bloquear la absorción de grasa.

25 También se describe un método para prevenir o tratar la obesidad, que comprende administrar una composición que comprende una cepa depositada con el NCIMB con el número de registro NCIMB 42019 a un sujeto que necesita prevenir o tratar la obesidad.

También se describe un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico relacionado con la obesidad, que comprende administrar una composición que comprende una cepa depositada con el NCIMB con el número de registro NCIMB 42019 a un sujeto que necesita prevenir o tratar el síndrome metabólico relacionado con la obesidad.

30 También se describe un método para prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), que comprende administrar una composición que comprende una cepa con el NCIMB con el número de registro NCIMB 42019 a un sujeto que necesita prevenir o tratar la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).

35 Se apreciará que la cepa específica de la invención puede administrarse a animales (incluidos seres humanos) en una forma ingerible por vía oral en una preparación convencional, tal como cápsulas, microcápsulas, comprimidos, gránulos, polvo, trociscos, píldoras, supositorios, suspensiones y jarabes. Las formulaciones adecuadas pueden prepararse por métodos de uso habitual usando aditivos orgánicos e inorgánicos convencionales. La cantidad de principio activo en la composición médica puede estar a un nivel que ejerza el efecto terapéutico deseado.

40 La formulación también puede incluir un componente bacteriano, una entidad farmacológica o un compuesto biológico. Además, una vacuna que comprende las cepas de la invención puede prepararse usando cualquier método conocido adecuado y puede incluir un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

45 La divulgación también incluye mutantes y variantes derivadas de la cepa de la invención, mientras sigue teniendo la actividad de la cepa depositada. Las variantes mutantes incluyen una cepa cuyas propiedades genéticas y/o fenotípicas están alteradas en comparación con la cepa original. Una variante de origen natural incluye las alteraciones espontáneas de las propiedades específicas aisladas selectivamente. La alteración deliberada de las propiedades de la cepa parental se logra mediante tecnologías de manipulación genética convencionales (*in vitro*), tal como alteración génica, transferencia conjugativa, etc. La modificación genética incluye la introducción de secuencias de ADN exógenas y/o endógenas en el genoma de una cepa, por ejemplo, mediante inserción en el genoma de la cepa bacteriana mediante vectores, incluyendo ADN plasmídico o bacteriófagos.

50 Las mutaciones naturales o inducidas incluyen al menos alteraciones de una sola base, tales como delección, inserción, transversión u otras modificaciones de ADN que pueden resultar en la alteración de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN.

55 Los términos mutante, variante y mutante genéticamente modificado también incluyen una cepa que ha sufrido alteraciones genéticas que se acumulan en un genoma a un ritmo que es consistente en la naturaleza para todos los microorganismos y/o alteraciones genéticas que se producen por mutación espontánea y/o adquisición de genes y/o pérdida de genes que no se logra mediante la manipulación deliberada (*in vitro*) del genoma, sino que se logra mediante la selección natural de variantes y/o mutantes que proporcionan una ventaja selectiva para apoyar la supervivencia de la bacteria cuando se expone a presiones ambientales, tales como antibióticos. Se puede crear un mutante mediante la inserción deliberada (*in vitro*) de genes específicos en el genoma que no alteran fundamentalmente la funcionalidad bioquímica del organismo pero cuyos productos pueden usarse para la identificación o selección de la bacteria, por ejemplo resistencia a los antibióticos.

Un experto en la materia apreciaría que las cepas mutantes o variantes pueden identificarse mediante análisis de homología de la secuencia de ADN con la cepa parental. Las cepas que tienen una identidad de secuencia cercana con la cepa parental sin diferencias funcionales fenotípicas o medibles demostrables se consideran cepas mutantes o variantes. Una cepa con una identidad de secuencia (homología) del 99,5 % o más con la secuencia del ADN parental puede considerarse mutante o variante. La homología de secuencia puede determinarse utilizando el programa "BLAST" del algoritmo de homología en línea, disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Los mutantes de la cepa parental también incluyen cepas derivadas que tienen al menos un 95,5 % de homología de secuencia con la secuencia polinucleotídica espaciadora intergénica 16s - 23s de la cepa parental. Estos mutantes pueden comprender además mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano.

Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción de algunas realizaciones de la misma, dada solo a modo de ejemplo, haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

la figura 1 muestra el volumen de la cepa de *L. casei* NCIMB 42019 y *B. longum* NCIMB 41003, medido por la altura del gránulo esponjoso del EPS;

la figura 2 es un gráfico de barras del % de adhesión al hexadecano de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS;

la figura 3 es una fotografía que muestra la capacidad de unión de la grasa de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de baja producción de EPS para unir grasa *in vitro* en comparación con el aglutinante de grasa XLS Medical comercialmente disponible que contiene Litramine™.

La figura 4 es un gráfico de inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con el EPS+ve *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* con baja producción de EPS. Hay una inducción mejorada de la citocina antiinflamatoria IL-10 después de la estimulación con el EPS+ ve *B. longum* NCIMB 41003 en relación con la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS;

la figura 5 es un gráfico de la inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* con baja producción de EPS. Hay una inducción disminuida de la inducción de la citocina proinflamatoria TNF- α después de la estimulación con el EPS+ ve *B. longum* NCIMB 41003 en relación con la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS;

la figura 6 es un gráfico de inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *L. casei* NCIMB 42019. Hay un ligero aumento en la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 después de la estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 en relación con *L. casei* NCIMB 42019;

la figura 7 es un gráfico de la inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *L. casei* NCIMB 42019. Hay un aumento de la inducción de TNF- α después de la estimulación con *L. casei* NCIMB 42019 en relación con *B. longum* NCIMB 41003;

la figura 8 ilustra que, en comparación con el grupo de control con dieta rica en grasas (HFD), *L. casei* NCIMB 42019 mostró una reducción significativa en la reducción de la ganancia de masa grasa en la semana 16, mientras que la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS no tuvo un efecto significativo;

la figura 9 muestra el efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre el peso de la almohadilla de grasa. *L. casei* NCIMB 42019 produjo una reducción significativa en el peso de las almohadillas de grasa (grasa subcutánea, tejido adiposo pardo (BAT) y grasa epididimaria) mientras que la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS no tuvo un efecto significativo;

la figura 10 ilustra el efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre el colesterol total hepático y los triglicéridos. *L. casei* NCIMB 42019 pero no la cepa de *Lactobacillus* bajo en EPS redujo el colesterol total hepático y los triglicéridos en ratones DIO;

la figura 11 ilustra el efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre el colesterol LDL en plasma;

la figura 12 ilustra el efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS en la glucosa en sangre terminal;

la figura 13 representa la ingesta acumulada de alimentos por ratón siguiendo *L. casei* NCIMB 42019 y una

administración de la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS en relación con el grupo de control con dieta rica en grasas (HFD) en el modelo de ratón DIO;

5 la figura 14 presenta la estimación del % de excreción de energía acumulada después de *L. casei* NCIMB 42019 y una administración de cepa de *Lactobacillus* baja en EPS en relación con el grupo de control con la dieta rica en grasas (HFD) en el modelo de ratón DIO;

10 la figura 15 (a) no muestra diferencias significativas en la excreción de grasa fecal/ratón/gramo el día 0, mientras que (b) presenta la estimación del % de excreción de grasa acumulada después de *L. casei* NCIMB 42019 y una administración de la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS en relación con el grupo de control con dieta rica en grasa (HFD) en el modelo de ratón DIO;

la figura 16 muestra el tránsito de *L. casei* NCIMB 42019 a números altos en ratones.

15 Descripción detallada de la invención

Se realizó un depósito de la cepa de *Lactobacillus* AH077 en National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 2 de agosto de 2012 y acordó el número de registro NCIMB 42019.

20 Esta especificación también hace referencia a modo de comparación con la cepa *Bifidobacterium longum* 35624 que se deposita en el National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 13 de enero de 1999 con el número de registro NCIMB 41003.

25 Ejemplos

Los inventores han descubierto que una nueva cepa de *Lactobacillus* productora de EPS (*L. casei* AH077) atenúa los marcadores asociados con la obesidad y los trastornos metabólicos asociados. La administración de *L. casei* AH077 se asoció con la alteración de la microbiota intestinal, disminución del almacenamiento de grasa y disminución de los niveles de triglicéridos hepáticos y colesterol total hepático y aumento de la excreción de grasa. Sorprendentemente, la administración de *B. longum* NCIMB41003 no tuvo el mismo efecto.

35 Ejemplo 1 - La identidad de *L. casei* NCIMB 42019 se confirmó mediante análisis BLAST de la región espaciadora intergénica (IGS).

Método

40 Se realizó la secuenciación del espaciador intergénico (IGS) 16s-23s para identificar *L. casei* NCIMB 42019. Brevemente, se aisló el ADN total de las cepas utilizando 100 µl de solución de extracción y 25 µl de solución de preparación de tejidos (Sigma-Aldrich, Kit XNAT2). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de 2 horas a 95 °C y luego se añadieron 100 µl de solución de neutralización (Sigma-Aldrich, kit XNAT2). La solución de ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop y se almacenó a 4 °C. La PCR se realizó utilizando los cebadores de IGS. Los pares de cebadores utilizados para la identificación de ambas cepas fueron IGS R 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' e IGS L 5'-GCTGGATCACCTCCTTTCT-3'. Las condiciones de ciclado fueron 94 °C durante 4 minutos (1 ciclo), 94 °C durante 45 segundos, 53 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 45 segundos (28 ciclos). La reacción de PCR contenía 2 µl (100 ng) de ADN, mezcla para PCR (Sigma-Aldrich, Red Taq), 0,025 nM de cebador L y R de IGS (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf. Los productos de PCR se procesaron junto con un marcador de peso molecular (Ladder de 100 pb, Roche) en un gel teñido con EtBr con agarosa al 2 % en TAE, para determinar el perfil de IGS. Los productos de PCR de *Bifidobacterium* (banda única) se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR Promega Wizard. Los productos de PCR de *Lactobacillus* producen 3 bandas. Se escindió la banda presente a aproximadamente 280 pb (banda más baja), se purificó usando la columna de centrifugación de agarosa GenElute (Sigma-Aldrich) y se volvió a secuenciar como se ha indicado anteriormente y el producto de PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR Promega Wizard. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en Beckman Coulter Genomics (Reino Unido) usando las secuencias de cebadores (anteriormente) para la región espaciadora intergénica. A continuación, los datos de secuencia se buscaron en la base de datos de nucleótidos de NCBI para determinar la identidad de la cepa por homología de nucleótidos. Los datos de la secuencia de ADN resultante se sometieron al motor de búsqueda BLAST de homología de nucleótido a nucleótido estándar de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para identificar la coincidencia más cercana a la secuencia.

Resultados

65 **La identidad de *L. casei* NCIMB 42019 se confirmó por análisis BLAST de la región espaciadora intergénica (IGS).**

Tabla 1: Resultados en BLAST de la región espaciadora intergénica (IGS) de *L. casei* NCIMB 42019.

Muestra	N.º de registro	Coincidencia más cercana en NCBI BLAST 12/07/15	Identities	% Coincidencia	pb
NCIMB	gb (CP012148.1)	Cepa de <i>Lactobacillus paracasei</i> L9, genoma completo	272/280	97 %	285
42019	gb (CP001084.2)	cepa de <i>Lactobacillus casei</i> Zhang, genoma completo			

Tabla 2: Secuencia de la región espaciadora intergénica (IGS) de *L. casei* NCIMB 42019.

Secuencia de la IGS de <i>L. casei</i> NCIMB 42019 (285 nt)	<p>TTGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAACAGACTGAAA GTCTGACGGAAACCTGCACACACGAACTTTGTTTAGT TTTG AGGGGATCACCCCTCAAGCACCCCTAACGGGTGCGACTTT GTTCTTTGAAAACCTGGATATCATTGTATTAATTGTTTT AAA TTGCCGAGAACACAGCGTATTTGTATGAGTTTCTGAAA AAGAAATTCGCATCGCATAACCGCTGACGCAGTCGAC AGTAT CGGTAAAGTTACAAAGGGCGCACGGTGGATGCCTTTGG CACCAGA</p>
---	---

5 **Ejemplo 2 - Prueba de gránulos esponjosos de EPS (volumen de la cepa)**

Método

10 Cada cepa se fermentó en un caldo. Las partículas recogidas después de la centrifugación se lavaron y posteriormente se secaron por congelación.

El polvo liofilizado, ajustado por el número total de células (2 x 10E10), se resuspendió en 10 ml de PBS y se centrifugó a 4.000 rpm/10 minutos/4 °C.

15 Resultados

Figura 1: Volumen de la cepa de *L. casei* NCIMB 42019 y *B. longum* NCIMB 41003, medido por la altura del gránulo esponjoso de EPS.

20 *B. longum* NCIMB 41003 produjo un gránulo esponjoso de 0,9 cm mientras que *L. casei* NCIMB 42019 produjo un gránulo esponjoso de 1,6 cm.

Conclusión

25 Se sabe que *B. longum* NCIMB 41003 es un gran productor de EPS. La prueba del gránulo esponjoso de EPS y la altura del gránulo resultante, confirma que las cepas son productores de EPS, con algunas cepas que producen más que otras.

30 **Ejemplo 3: Ensayo de adhesión microbiana al hexadecano (MATH)**

La hidrofobicidad es la propiedad física de una molécula por la cual repele el agua. Los materiales hidrofóbicos se utilizan para eliminar el aceite del agua, el manejo de derrames de petróleo y procesos de separación química para eliminar sustancias no polares de compuestos polares. La hidrofobicidad de una célula bacteriana depende de la composición de su superficie celular con respecto a las proteínas, péptidos y polisacáridos presentes. La capacidad de una cepa probiótica para adherirse a la mucosa intestinal ayuda a la célula bacteriana a establecerse durante el tránsito gastrointestinal, proporcionándole una ventaja competitiva en el intestino. La hidrofobicidad de una cepa es

un factor que contribuye a la capacidad adhesiva. La determinación de la adhesión bacteriana al hexadecano como una indicación de la capacidad de las cepas para adherirse a las células epiteliales intestinales es un enfoque cualitativo válido (Kiely y Olson, 2000).

5 Método

La capacidad de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS para adherirse al hexadecano como una medida de su hidrofobicidad se determinó usando la prueba de adhesión microbiana al hexadecano (MATH). La adhesión al hexadecano se midió de acuerdo con el método de Rosenberg *et al.*, 1980 con algunas modificaciones (Crow y Gopal, 1995; Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Las bacterias se cosecharon en la fase estacionaria por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 0,1 mol/l de KNO₃ (pH 6,2) a una DO₆₀₀ de 0,8. La absorbancia de la suspensión celular se midió a 600 nm (AO). Se añadieron 2 ml de hexadecano (Sigma Aldrich) a 2 ml de suspensión celular. Después de 10 minutos de preincubación a temperatura ambiente, el sistema de dos fases se mezcló mediante agitación vorticial durante 2 minutos. La fase acuosa se eliminó después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 600 nm (A1). El % de adhesión bacteriana al hexadecano se calculó como $(1-A1/AO) \times 100$, donde AO y A1 son la absorbancia antes y después de la extracción con los disolventes, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado con células procedentes de cultivos independientes.

20 Resultados

Figura 2: % de adhesión de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS al hexadecano como medida de su hidrofobicidad.

25 Conclusión

L. casei NCIMB 42019 (65,6 %) mostró una mayor afinidad por el hexadecano, lo que indica que tenía mayor hidrofobicidad, en comparación con una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS (50,2 %).

30 **Ejemplo 4 - Capacidad de unión a la grasa**

Se investigó la capacidad de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de baja producción de EPS para unir grasa *in vitro*.

Método

Se mezclaron 5×10^{10} células de *L. casei* NCIMB 42019 y 5×10^{10} células de la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS con 10 ml de PBS. A continuación se añadieron 10 ml de aceite de oliva. La mezcla se agitó vorticialmente de forma intensa y se incubó a 37 °C con agitación. Después de 2 horas de incubación, la mezcla se centrifugó a 675 g durante 10 minutos. Las capas de grasa no unidas (capa superior), como una indicación de la capacidad de unión de la grasa de las cepas, se compararon visualmente. Se incluyó un aglutinante de grasa disponible en el mercado (XLS Medical) que contenía el principio activo Litramine™ (sobre de 2 g + 10 ml de PBS + 10 ml de aceite de oliva). También se incluyó un control que contenía 10 ml de PBS y 10 ml de aceite de oliva solamente.

Resultados

La figura 3 muestra que la capa de grasa no unida es claramente visible como la capa superior para todas las muestras. La capa de grasa no unida observada para *L. casei* NCIMB 42019 es significativamente más pequeña que la capa de grasa no unida observada para la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS y los controles negativos y positivos.

Conclusión

En comparación con la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS y el aglutinante de grasas XLS Medical disponible comercialmente, *L. casei* NCIMB 42019 demuestra una mayor capacidad para unirse a la grasa *in vitro*.

Ejemplo 5 - Perfiles antiinflamatorios en PBMC

El perfil antiinflamatorio de *L. casei* NCIMB 42019 y *B. longum* NCIMB 41003 se examinó evaluando la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina proinflamatoria TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Método

Ensayo de inducción de citocinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se obtuvo sangre de tres voluntarios sanos bajo la aprobación del Comité de Ética de Investigación Clínica de los

Hospitales de Enseñanza de Cork. Los sujetos eran todos y se habían abstenido de uso de probióticos, antibióticos o antiinflamatorios durante un mes o más antes de la donación de sangre. Las PBMC se extrajeron de la sangre completa mediante separación por gradiente de densidad usando histopaco (Sigma-Aldrich), un polisacárido hidrofílico que separa las capas de sangre, con una "capa leucocitaria" que se forma debajo de una capa de plasma que contiene las PBMC. Para cada cepa, se pesaron 100 mg de polvo liofilizado y se volvieron a suspender en PBS estéril de Dulbecco (Sigma-Aldrich). Las células bacterianas se lavaron dos veces mediante centrifugación (4.000 rpm/10 min/4 °C/freno 0) y se resuspendieron en PBS estéril. Se realizaron recuentos microscópicos directos y las preparaciones celulares se diluyeron a las concentraciones apropiadas para dar una relación de 100:1; 50:1; 25:1 de bacterias totales: células PBMC. Las réplicas técnicas se realizaron por triplicado. A continuación, las PBMC se incubaron a una concentración de 2×10^5 células/ml durante 48 horas a 37 °C (en presencia de penicilina y estreptomycin (Sigma-Aldrich)) con medios de control, o con concentraciones crecientes de las cepas bacterianas: 1×10^6 células/ml (25:1 Bacterias:PBMC), 1×10^7 células/ml (50:1 Bacterias:PBMC) y 2×10^7 células/ml (100:1 Bacterias:PBMC). Los sobrenadantes se analizaron para determinar la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina proinflamatoria TNF- α , que se midieron utilizando los kits de cultivo de tejido de plataforma múltiple MesoScale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Maryland, EE.UU.). *B. longum* NCIMB 41003, que previamente se demostró que tenía actividad antiinflamatoria (Groeger et al., 2013) se utilizó como control positivo para validar la precisión del ensayo.

Resultados

Figura 4: Inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con EPS + ve *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* con baja producción de EPS. Existe una inducción mejorada de la citocina antiinflamatoria IL-10 después de la estimulación con el EPS + ve *B. longum* NCIMB 41003 en relación con la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS.

Figura 5: Inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* con baja producción de EPS. Hay una inducción disminuida de la inducción de la citocina proinflamatoria TNF- α después de la estimulación con el EPS + ve *B. longum* NCIMB 41003 en relación con la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS.

Figura 6: Inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con *B. longum* ADX 41003 y *L. casei* ADX 42019. Hay un ligero aumento en la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 después de la estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 en relación con *L. casei* NCIMB 42019.

Figura 7: Inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas en PBMC después de 48 horas de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *L. casei* NCIMB 42019. Hay un aumento de la inducción de TNF- α después de la estimulación con *L. casei* NCIMB 42019 en relación con *B. longum* NCIMB 41003.

Conclusión

L. casei NCIMB 42019 y *B. longum* NCIMB 41003, que son ricas en EPS, inducen perfiles inmunitarios antiinflamatorios similares en un ensayo de inducción de citocinas en PBMC. La cepa con baja producción de EPS produce un perfil inmunitario muy diferente.

Ejemplo 6 - Efecto de la administración de *L. casei* NCIMB 42019, una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS y *B. longum* NCIMB 41003 sobre resultados metabólicos en el modelo de ratón con obesidad inducida por la dieta (DIO)

Método

Animales

Ratones macho C57BL/6JRccHsd de 7 semanas de edad (Harlan Laboratories, Países Bajos) (72 ratones, n = 12 por grupo), aleatorizados en función del peso corporal, se mantuvieron en un ambiente controlado con 22 ± 3 °C de temperatura, 50 ± 20 % de humedad, un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno y 15-20 cambios de aire fresco por hora. Se alojó a los ratones en grupo (4 ratones por jaula) y se usó mazorca de maíz en autoclave como material del lecho. Los ratones se recibieron a las 5 semanas de edad y se pusieron en cuarentena durante una semana seguidos de aclimatación durante una semana antes del comienzo del estudio. Desde el día 0 se alimentó a los ratones, *ad libitum*, y los ratones en cada jaula recibieron 50 ml de agua potable estéril (grupos 1 y 2; Tabla 1) o agua potable que contiene probióticos liofilizados (1×10^9 ufc/dosis/día) a través de botellas de policarbonato provistas de tubos de acero inoxidable (grupos 3, 4, 5 y 6; Tabla 1). El tratamiento continuó durante 16 semanas.

Diseño experimental

Desde el Día 0 en adelante, se alimentó al grupo 1 con una dieta baja en grasas (LFD) D12450 (10 % kcal % de

grasa, irradiada con rayos gamma; Research Diets Inc, EE.UU.) y se alimentó a los otros cinco grupos (grupos 2 a 6) con una dieta rica en grasas (HFD) D12451 (45 % kcal % de grasa, irradiada con rayos gamma; Research Diets Inc) durante un período de 16 semanas. La alimentación con HFD indujo resistencia a la insulina y obesidad en animales, que se caracterizó por un aumento en el peso corporal y valores de glucosa en sangre en ayunas. Los grupos 1 y 2 recibieron agua potable estéril normal, mientras que los grupos 3, 4, 5 y 6 recibieron agua potable que contenía 1×10^9 ufc/dosis/día del probiótico apropiado (Tabla 1). La observación general de salud se realizó diariamente a la misma hora del día. Esto incluyó el estado de alerta, la textura del cabello, el movimiento de la jaula y la presencia de cualquier secreción nasal, ocular, de la boca y de las orejas. El alimento previamente medido se mantuvo en cada jaula y el alimento sobrante se midió y registró cada tres días para acceder a la cantidad de alimento consumido por los ratones. El consumo de agua de los animales se midió diariamente a partir del primer día de dosificación. Los ratones en cada jaula (n = 4) recibieron 50 ml de agua diariamente. El agua restante en cada jaula se midió cada 24 horas.

Pesos y muestreo de tejidos

Los pesos corporales se registraron individualmente para todos los animales en el momento de la recepción, el día de aleatorización, antes del tratamiento y una vez cada tres días a partir de entonces. El cambio porcentual en el peso corporal se calculó de acuerdo con la fórmula $(TT-TC)/TC * 100$ donde TT es el día de la prueba tratado y TC es el control del día de prueba. Los ratones fueron sometidos a ecografía por resonancia magnética (MRI) utilizando una ecografía por resonancia magnética (EchoMRI-700™) los días -1 y 28, 56, 84 y 112 para evaluar la composición de grasa corporal y masa magra. El animal se colocó en un soporte de plástico sin sedación ni anestesia. La grasa se mide como la masa de todas las moléculas de grasa en el cuerpo. El magro es una masa de tejido muscular equivalente a todas las partes del cuerpo que contienen agua. La contribución al "agua libre" proviene principalmente de la vejiga. El agua total incluye tanto el agua libre como el agua contenida en la masa magra, que es todo el contenido de agua del cuerpo. Los soportes de plástico fueron desinfectados entre animales de diferentes grupos para evitar la contaminación cruzada. Se siguió una técnica aséptica mientras se manejaban animales de diferentes grupos. Al final de la semana 16, se sacrificó a los animales mediante asfixia con CO₂. Se extrajeron el hígado, el músculo esquelético, la grasa visceral (epididimaria, renal y mesentérica), la grasa subcutánea, el bazo, el ciego, la grasa de tejido adiposo pardo, el cerebro y el intestino, se pesaron y se almacenaron a -80 °C para futuros análisis bioquímicos y genéticos.

Marcadores metabólicos

Se recogieron muestras de sangre a las 9 de la mañana por el método de corte de la cola los días 0, 30, 60, 90 y 112 para mediciones aleatorias de glucosa en sangre (se realizaron 5 muestreos en total), comenzando/incluido el primer día de dosificación. El análisis de glucosa en sangre se realizó mediante el glucómetro Johnson and Johnson (One touch Ultra 2). Se siguió una técnica aséptica mientras se manejaban animales de diferentes grupos. Al final de las 16 semanas, se dejó ayunar a los ratones durante 6 horas y se extrajo sangre mediante el método de corte de la cola (modo no anestésico de extracción de sangre) para la estimación de la glucosa en sangre. La sangre se extrajo mediante un método de punción retroorbital con anestesia ligera con isoflurano y se separó el plasma, que se utilizó para estimar el colesterol total (CT), los triglicéridos (TG), el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los ácidos grasos no esterificados (NEFA) mediante analizador químico clínico de registro aleatorio totalmente automatizado (EM-360, Erba Mannheim, Alemania). Los niveles de VLDL en plasma se obtuvieron mediante el método de cálculo: $(VLDL = \text{triglicéridos (mg/dl)}/5)$. Para la estimación hepática de CT y TG, el hígado se homogeneizó en isopropanol (1 ml/50 mg de tejido) y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 2.500 rpm. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos en los sobrenadantes se midieron mediante un analizador químico clínico de registro aleatorio totalmente automatizado (EM-360, Erba Mannheim).

Análisis de la expresión génica

Se analizó la expresión de los genes implicados en la regulación y las vías enzimáticas del metabolismo de los ácidos grasos y la inflamación. El ARN total se preparó a partir de muestras de hígado usando el RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Alemania). El ADNc se preparó mediante transcripción inversa de 1 µg de ARN total usando el kit Reverse Transcription System (QIAGEN). El ADNc de cada grupo se combinó y se cribó para cada muestra de ADNc combinada usando Mouse Fatty Acid Metabolism RT² Profiler PCR Array (QIAGEN) conforme a las instrucciones del fabricante. El análisis de datos se realizó utilizando el software en línea QIAGEN RT² Profiler PCR Array acompañante. Los datos se presentan como un cambio en la cantidad de regulación del control de la dieta baja en grasas frente al control de la dieta rica en grasas y el cambio en la cantidad de regulación de los probióticos frente al control de la dieta rica en grasas. Un punto de corte inferior a 2 veces la regulación se consideró como ningún cambio.

Estimación de la excreción de energía

Se recogieron dos gránulos fecales de cada ratón en las semanas 6, 10 y 15 y se analizaron para determinar su valor calorífico bruto mediante calorimetría de bomba. Para el análisis de calorimetría de bomba, las muestras se

5 pesaron y secaron al horno a 60 °C durante 48 horas. El contenido de energía de las heces se evaluó con un calorímetro Parr 6100 utilizando una semi-micro bomba 1109 (Parr Instruments & Co., Moline, Illinois, EE.UU.). El factor equivalente de energía calorimétrica se determinó utilizando patrones de ácido benzoico y cada muestra (100 mg) se analizó por triplicado. La excreción acumulada de energía de los ratones alimentados con probióticos en el transcurso del estudio se estimó como un porcentaje relativo a la energía excretada por los ratones del grupo de control con dieta rica en grasas.

Estimación de la excreción de grasa

10 Se recogieron dos gránulos fecales de cada ratón en las semanas 0, 6, 10 y 14 y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis. El contenido de grasa fecal se determinó de acuerdo con un método modificado de Folch *et al.* (Folch *et al.*, 1957, Kraus, 2015). Las muestras fecales se pesaron en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml (Sarstedt) y se añadió agua desionizada (10x v/p). Las muestras se agitaron en vórtex durante 60 segundos a alta velocidad a remojo durante la noche a temperatura ambiente. Para extraer los lípidos, se añadió 4x el volumen de la mezcla de cloroformo y metanol (2:1 v: v) a agua desionizada y se agitó vorticialmente durante 60 segundos a alta velocidad. La mezcla se centrifugó luego a 2.000 g durante 10 minutos. La capa lipofílica inferior de la extracción se recogió mediante la inserción de una aguja hipodérmica de 22G 1½ (BD) a través de la pared del tubo y se drenó en tubos previamente pesados. La capa lipofílica recogida se dejó secar durante la noche. El contenido de grasa total se pesó utilizando una balanza analítica de laboratorio (Sartorius). La excreción acumulada de grasa de los ratones alimentados con probióticos durante el transcurso del estudio se estimó como un porcentaje en relación con la grasa excretada por los ratones del grupo de control alimentados con la dieta rica en grasas.

Análisis estadístico

25 El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t no apareada para las diferencias entre dos grupos. Al evaluar más de dos grupos se usó un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los datos se analizaron con GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (software GraphPad). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando p <0,05.

30 **Tabla 5:** Grupos experimentales y regímenes de dieta y tratamiento asociados. LFD = control de dieta baja en grasas; HFD = control de dieta rica en grasas.

Grupos	Número de ratones/grupo	Régimen de dieta	Régimen de tratamiento
Grupo 1 (control LFD)	12	10 % de grasa kcal	Agua potable estéril normal, diariamente
Grupo 2 (control HFD)	12	45 % de grasa kcal	Agua potable estéril normal, diariamente
Grupo 3 (HFD + <i>L. casei</i> NCIMB 42019)	12	45 % de grasa kcal	1 x 10 ⁹ ufc/dosis/día en agua potable, diariamente
Grupo 4 (HFD + cepa de <i>Lactobacillus</i> pobre en EPS)	12	45 % de grasa kcal	1 \ 1 x 10 ⁹ ufc/dosis/día en agua potable, diariamente
Grupo 6 (HFD + <i>B. longum</i> NCIMB 41003)	12	45 % de grasa kcal	1 x 10 ⁹ ufc/dosis/día en agua potable, diariamente

Resultados

35 Figura 8: En comparación con el grupo de control con dieta rica en grasas (HFD), *L. casei* NCIMB 42019 mostró una reducción significativa en la ganancia de masa grasa en la semana 16, mientras que la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS no tuvo un efecto significativo.

40 Figura 9: Efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre el peso de la almohadilla de grasa. *L. casei* NCIMB 42019 tuvo una reducción significativa en el peso de las almohadillas de grasa (grasa subcutánea, tejido adiposo pardo (BAT) y grasa epididimaria) mientras que la cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS no tuvo un efecto significativo.

45 **Figura 10:** Efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre el colesterol hepático total y los triglicéridos. *L. casei* NCIMB 42019 pero no la cepa de *Lactobacillus* baja en EPS redujo el colesterol total hepático y los triglicéridos en ratones con DIO.

Figura 11: Efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre LDL-colesterol en plasma.

Figura 12: Efecto de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS sobre la glucemia terminal.

Figura 13: Ingesta acumulada de alimentos por ratón después de la administración de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS en relación con el grupo de control de dieta rica en grasas (HFD) en el modelo de ratón con DIO.

Figura 14: Estimación del % de excreción de energía acumulada después de la administración de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS en relación con el grupo de control de dieta rica en grasas (HFD) en el modelo de ratón con DIO.

Figura 15: Excreción de grasa fecal/ratón/gramo el día 0. No hubo diferencias significativas en la excreción de grasa fecal entre los grupos el día 0.

Figura 16: Estimación del % de excreción acumulada de grasa después de la administración de *L. casei* NCIMB 42019 y una cepa de *Lactobacillus* pobre en EPS en relación con el grupo de control de dieta rica en grasas (HFD) en el modelo de ratón con DIO.

Tabla 6: Perfiles de expresión para genes implicados en la regulación y las vías enzimáticas del metabolismo de los ácidos grasos y la inflamación. *L. casei* NCIMB 42019 regula por disminución los genes asociados con el metabolismo y el transporte del colesterol, la señalización de adipocinas, la β -oxidación y la fosforilación oxidativa de una manera específica de la cepa. *L. casei* NCIMB 42019 regula por aumento la citocina antiinflamatoria IL-10 y regula por disminución la citocina proinflamatoria TNF α , independiente de la dieta, de una manera específica de la cepa.

Tabla 6: Perfiles de expresión para genes implicados en la regulación y las vías enzimáticas del metabolismo de los ácidos grasos y la inflamación en el hígado. NC = Sin cambio (es decir, por debajo del límite de 2 veces la regulación). + = regulación por incremento; -= regulación por disminución.

Función del gen	Símbolo del gen	Información del gen	LFD frente a HFD (cantidad de regulación)	HFD frente a NCIMB 42019 (Δ cantidad de regulación)	HFD frente a Lac pobre en EPS (Δ cantidad de regulación)
METABOLISMO/TRANSPORTE DEL COLESTEROL	Cyp2e1	Citocromo p450, familia 2, subfamilia e, polipéptido 1	+5,063	-2,5663	NC
	Cyp7a1	Citocromo p450, familia 7, subfamilia a, polipéptido 1	+4,1989	-3,4928	NC
	Abcg1	casete de unión a ATP, subfamilia G (BLANCO), miembro 1	NC	-4,1894	NC
	Srebf2	factor de transcripción 2 de unión al elemento regulador de esteroides	NC	-2,9725	NC
	Abca1	casete de unión a ATP, subfamilia A (ABCI), miembro 1; CERP, proteína reguladora del flujo de salida del colesterol	NC	-2,5967	NC
	Nr1h4	subfamilia 1 de receptores nucleares, grupo H, miembro 4; receptor de ácido biliar	NC	-2,4079	NC

(continuación)

Función del gen	Símbolo del gen	Información del gen	LFD frente a HFD (cantidad de regulación)	HFD frente a NCIMB 42019 (Δ cantidad de regulación)	HFD frente a Lac pobre en EPS (Δ cantidad de regulación)
SEÑALIZACIÓN DE ADIPOCINA	Slc2a4	Familia 2 de transportador de solutos (transportador facilitado de glucosa), miembro 4; GLUT4	-2,0279	-8,3109	NC
	Serpine1	Inhibidor de la serina (o cisteína) peptidasa, clado E, miembro 1	-2,9282	-8,3074	NC
	Adipor1	Receptor 1 de adiponectina	NC	-2,9511	NC
	Slc2a1	Familia 2 de transportador de solutos (transportador facilitado de glucosa), miembro 1; GLUT1	NC	-2,8817	NC
	TNF	Fas (miembro 6 de la superfamilia de receptores de TNF)	NC	-2,8524	NC
	Akt1	Protooncogén 1 de timoma viral	NC	-2,2818	NC
OTROS TRANSPORTES METABOLISMO DE LÍPIDOS	Slc27a5	Familia 27 de transportadores de solutos (transportador de ácidos grasos), miembro 5	NC	-2,9246	NC
β-OXIDACIÓN	Fabp1	Proteína de unión a ácido graso 1	NC	-3,3444	NC
	Akt1	Protooncogén 1 de timoma viral	NC	-2,2818	NC
FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	Ndufb6	Subcomplejo beta de la NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1, 6	NC	-2,7981	NC
RESPUESTA INFLAMATORIA	IL10	Interleucina 10	NC	+2,6867	NC
	TNF	Fas (miembro 6 de la superfamilia de receptores de TNF)	NC	-2,8524	NC

Sorprendentemente, la cepa *B. longum* NCIMB 41003 productora de EPS no tuvo ningún efecto significativo en este modelo.

5

Conclusión

La administración de *L. casei* NCIMB 42019 codujo a una reducción significativa en masa grasa a la semana número dieciséis. Esto se acompañó de una reducción estadísticamente significativa de la grasa subcutánea, el tejido adiposo pardo y la grasa epididimaria para *L. casei* NCIMB 42019. La administración de *L. casei* NCIMB 42019 condujo a una reducción significativa en los niveles de colesterol total y triglicéridos hepáticos en comparación con el grupo de control de HFD. *L. casei* NCIMB 42019 altera las rutas metabólicas alteradas de una manera específica de la cepa. A pesar de no haber diferencias significativas en la ingesta acumulada de alimentos en el transcurso del estudio, los autores observaron un aumento en el % de excreción de energía para *L. casei* NCIMB 42019, que se acompañó de un aumento en el % de excreción de grasa, lo que sugiere que la administración de la cepa *L. casei* NCIMB 42019 hidrofóbica de unión a grasas puede reducir la cantidad de grasa extraída de los alimentos ingeridos, lo que podría ser responsable de las mejoras en los resultados metabólicos observados en este modelo de ratón con DIO.

15

20 **Ejemplo 6 - Tránsito de *L. casei* NCIMB 42019 a través del tracto gastrointestinal *in vivo*.**

Método

5 La capacidad de *L. casei* NCIMB 42019 para transitar *in vivo* se demostró en ratones evaluados en ratones C57BL/J6 macho de siete semanas de edad durante un período de 60 días (n = 5). *L. casei* NCIMB 42019 se administró en agua potable a una concentración diaria de 1×10^9 UFC/dosis de 4 ml. Se recogieron muestras fecales a los 0, 3, 10, 28 y 60 días y se recuperó *L. casei* NCIMB 42019 mediante recubrimiento en placa sobre MRS + rifampicina (50 µg/ml; Sigma-Aldrich).

10 Resultado

La **Figura 16** muestra los tránsitos de *L. casei* NCIMB 42019 en grandes cantidades en ratones. *L. casei* NCIMB 42019 se detectó en heces el día 3 a aproximadamente 1×10^5 UFC/g. La detección había aumentado a aproximadamente 1×10^8 UFC/g el día 10 con niveles que alcanzaron aproximadamente 1×10^9 UFC/g para el día 15 28.

Conclusión

20 *L. casei* NCIMB 42019 transita en grandes cantidades *in vivo*.

Prebióticos

La introducción de organismos probióticos se logra mediante la ingestión del microorganismo en un vehículo adecuado. Sería ventajoso proporcionar un medio que promueva el crecimiento de estas cepas probióticas en el intestino grueso. La adición de uno o más oligosacáridos, polisacáridos u otros prebióticos aumentan el crecimiento de bacterias del ácido láctico en el tracto gastrointestinal. Los prebióticos se refieren a cualquier componente alimenticio no viable que es fermentado específicamente en el colon por bacterias indígenas que se consideran de valor positivo, por ejemplo, bifidobacterias, lactobacilos. Los tipos de prebióticos pueden incluir aquellos que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa. La administración combinada de una cepa probiótica con uno o más compuestos prebióticos puede mejorar el crecimiento del probiótico administrado *in vivo*, dando como resultado un beneficio para la salud más pronunciado, y se denomina simbiótico.

Otros principios activos

35 Se apreciará que las cepas probióticas se pueden administrar profilácticamente o como un método de tratamiento solo o con otros materiales probióticos y/o prebióticos como se ha descrito anteriormente. Además, las bacterias pueden usarse como parte de un régimen profiláctico o de tratamiento usando otros materiales activos como los que se usan para tratar la inflamación u otros trastornos, especialmente aquellos con compromiso inmunológico. Dichas combinaciones pueden administrarse en una formulación única o como formulaciones separadas administradas en el mismo o diferentes momentos y usando las mismas o diferentes vías de administración.

Formulaciones

45 Una o más de las cepas de la invención pueden administrarse a animales (incluidos seres humanos) en una forma ingerible por vía oral en una preparación convencional, tal como cápsulas, microcápsulas, comprimidos, gránulos, polvo, trociscos, píldoras, supositorios, suspensiones y jarabes. Las formulaciones adecuadas pueden prepararse por métodos de uso habitual usando aditivos orgánicos e inorgánicos convencionales. La cantidad de principio activo en la composición médica puede estar a un nivel que ejerza el efecto terapéutico deseado.

50 La formulación también puede incluir un componente bacteriano, una entidad farmacológica o un compuesto biológico.

Además, una vacuna que comprende una o más de las cepas de la invención puede prepararse usando cualquier método conocido adecuado y puede incluir un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

55 Las cepas de la invención pueden formularse para facilitar la liberación controlada, tal como una liberación retardada de la cepa. Por ejemplo, la formulación puede adaptarse para liberar la cepa en una ubicación particular en el tracto gastrointestinal, tal como el intestino delgado o el colon. Para lograr tal liberación controlada, la cepa puede formularse en una cápsula que tiene un recubrimiento que está adaptado para liberar la cepa en un lugar particular. Hay disponible una gama de recubrimientos para facilitar dicha liberación controlada. Una de tales familias de recubrimientos son los disponibles bajo la marca registrada Eudragit.

Referencias

65 ADAMS, E. L., RICE, P. J., GRAVES, B., ENSLEY, H. E., YU, H., BROWN, G. D., GORDON, S., MONTEIRO, M. A., PAPP-SZABO, E., LOWMAN, D. W., POWER, T. D., WEMPE, M. F. y WILLIAMS, D. L. 2008. La interacción

diferencial de alta afinidad de la dectina-1 con glucanos naturales o sintéticos depende de la estructura primaria y está influenciada por la longitud de la cadena del polímero y la ramificación de la cadena lateral. *J Pharmacol Exp Ther*, 325, 115-23.

- 5 ARONSSON, L., HUANG, Y., PARINI, P., KORACH-ANDRE, M., HAKANSSON, J., GUSTAFSSON, J. A., PETTERSSON, S., ARULAMPALAM, V. y RAFTER, J. 2010. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLoS One*, 5.
- 10 BACKHED, F., DING, H., WANG, T., HOOPER, L. V., KOH, G. Y., NAGY, A., SEMENKOVICH, C. F. y GORDON, J. I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15718-23.
- 15 BACKHED, F., MANCHESTER, J. K., SEMENKOVICH, C. F. y GORDON, J. I. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 979-84.
- BLAND, E. J., KESHAVARZ, T. y BUCKE, C. 2004. The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydr Res*, 339, 1673-8.
- 20 CANI, P. D., AMAR, J., IGLESIAS, M. A., POGGI, M., KNAUF, C., BASTELICA, D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., TUOHY, K. M., CHABO, C., WAGET, A., DELMEE, E., COUSIN, B., SULPICE, T., CHAMONTIN, B., FERRIERES, J., TANTI, J. F., GIBSON, G. R., CASTEILLA, L., DELZENNE, N. M., ALESSI, M. C. y BURCELIN, R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56, 1761-72.
- 25 CANI, P. D., BIBILONI, R., KNAUF, C., WAGET, A., NEYRINCK, A. M., DELZENNE, N. M. y BURCELIN, R. 2008a. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57, 1470-81.
- 30 CANI, P. D., DELZENNE, N. M., AMAR, J. y BURCELIN, R. 2008b. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)*, 56, 305-9.
- 35 FANNING, S., HALL, L. J., CRONIN, M., ZOMER, A., MACSHARRY, J., GOULDING, D., MOTHERWAY, M. O., SHANAHAN, F., NALLY, K., DOUGAN, G. y VAN SINDEREN, D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2108-13.
- FOLCH, J., LEES, M. y SLOANE STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497-509.
- 40 GREGOR, M. F. y HOTAMISLIGIL, G. S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 29, 415-45.
- 45 GUH, D. P., ZHANG, W., BANSBACK, N., AMARSI, Z., BIRMINGHAM, C. L. y ANIS, A. H. 2009. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 9, 88.
- GUPTA, S., RICHARD, L. y FORSYTHE, A. 2015. The humanistic and economic burden associated with increasing body mass index in the EU5. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 8, 327-38.
- 50 HIDALGO-CANTABRANA, C., LOPEZ, P., GUEIMONDE, M., DE LOS REYES-GAVILAN, C., SUAREZ, A., MARGOLLES, A. y RUAS-MADIEDO, P. 2012. Immune Modulation Capability of Exopolysaccharides Synthesised by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 227-237.
- 55 HIDALGO-CANTABRANA, C., NIKOLIC, M., LOPEZ, P., SUAREZ, A., MILJKOVIC, M., KOJIC, M., MARGOLLES, A., GOLIC, N. y RUAS-MADIEDO, P. 2014. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe*, 26, 24-30.
- 60 JONES, S. E., PAYNICH, M. L., KEARNS, D. B. y KNIGHT, K.L. 2014. Protection from intestinal inflammation by bacterial exopolysaccharides. *J Immunol*, 192, 4813-20.
- 65 KAHN, S. E., HULL, R. L. y UTZSCHNEIDER, K. M. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-6.
- KANKAINEN, M., PAULIN, L., TYNKKYNEN, S., VON OSSOWSKI, I., REUNANEN, J., PARTANEN, P.,

- 5 SATOKARI, R., VESTERLUND, S., HENDRICKX, A. P., LEBEER, S., DE KEERSMAECKER, S. C., VANDERLEYDEN, J., HAMALAINEN, T., LAUKKANEN, S., SALOVUORI, N., RITARI, J., ALATALO, E., KORPELA, R., MATTILA-SANDHOLM, T., LASSIG, A., HATAKKA, K., KINNUNEN, K. T., KARJALAINEN, H., SAXELIN, M., LAAKSO, K., SURAKKA, A., PALVA, A., SALUSJARVI, T., AUVINEN, P. y DE VOS, W.M. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17193-8.
- 10 KOTZAMPASSI, K., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. y STAVROU, G. 2014. Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. *ISRN Obes*, 2014, 651895.
- KRAUS, D., YANG, Q. y KAHN, B. B. 2015. Lipid Extraction from Mouse Feces. *Bio-protocol*, 5, e1375.
- 15 LEE, H. Y., PARK, J. H., SEOK, S. H., BAEK, M. W., KIM, D. J., LEE, K. E., PAEK, K. S., LEE, Y. y PARK, J. H. 2006. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 736-44.
- 20 NAITO, E., YOSHIDA, Y., MAKINO, K., KOUNOSHI, Y., KUNIHICO, S., TAKAHASHI, R., MATSUZAKI, T., MIYAZAKI, K. y ISHIKAWA, F. 2011. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J Appl Microbiol*, 110, 650-7.
- 25 RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., CHENG, J., DUNCAN, A. E., KAU, A. L., GRIFFIN, N. W., LOMBARD, V., HENRISSAT, B., BAIN, J. R., MUEHLBAUER, M. J., ILKAYEVA, O., SEMENKOVICH, C. F., FUNAI, K., HAYASHI, D. K., LYLE, B. J., MARTINI, M. C., URSELL, L. K., CLEMENTE, J. C., VAN TREUREN, W., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., NEWGARD, C. B., HEATH, A. C. y GORDON, J. I. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341, 1241214.
- 30 TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. y GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-4.
- 35 TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. y GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-31.
- VINDEROLA, G., PERDIGON, G., DUARTE, J., FARNWORTH, E. y MATAR, C. 2006. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36, 254-60.
- 40 VOLMAN, J. J., RAMAKERS, J. D. y PLAT, J. 2008. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav*, 94, 276-84.
- 45 VRIEZE, A., VAN NOOD, E., HOLLEMAN, F., SALOJARVI, J., KOOTTE, R. S., BARTELSMAN, J. F., DALLINGATHIE, G. M., ACKERMANS, M. T., SERLIE, M. J., OOZEER, R., DERRIEN, M., DRUESNE, A., VAN HYLCKAMA Vlieg, J. E., BLOKS, V. W., GROEN, A. K., HEILIG, H. G., ZOETENDAL, E. G., STROES, E. S., DE VOS, W. M., HOEKSTRA, J. B. & NIEUWDORP, M. 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143, 913-6.e7.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Alimentary Health Limited
- <120> *Lactobacillus casei* para el tratamiento de la obesidad y los trastornos metabólicos asociados
- <130> ALIM57/C/WO
- 55 <150> EP15199657.6
- <151> 11-12-2015
- <160> 3
- 60 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 285
- <212 >ADN
- 65 <213> *Lactobacillus casei*

ES 2 807 915 T3

```

<400> 1
ttgctggatc acctcctttc taaggaaaca gactgaaagt ctgacggaaa cctgcacaca      60
cgaaactttg tttagttttg aggggatcac cctcaagcac cctaacgggt gcgactttgt      120
tctttgaaaa cctggatatac attgtattaa ttgttttaaa ttgccgagaa cacagcgtat      180
ttgtatgagt ttctgaaaaa gaaattcgca tcgcataacc gctgacgcag tcgacagtat      240
cggttaagtt acaaagggcg cacggtggat gcctttggca ccaga                        285

5  <210> 2
   <211> 18
   <212 >ADN
   <213> Desconocido

10 <220>
   <223> Secuencia sintetizada

   <400> 2
   ctggtgcaa ggcaccca      18

15 <210> 3
   <211> 19
   <212 >ADN
   <213> Desconocido

20 <220>
   <223> Secuencia sintetizada

   <400> 3
25 gctggatcac ctccttct      19

```

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactobacillus casei* AH077 depositada con el NCIMB con el número de registro 42019.
- 5 2. Una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 en forma de células viables o células no viables.
3. Una formulación que comprende una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
- 10 4. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además un material probiótico y/o un material prebiótico.
5. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende además un vehículo ingerible.
- 15 6. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el vehículo ingerible es un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo, o en la que el vehículo ingerible es un producto alimenticio, tal como la leche acidificada, yogur, yogur congelado, leche en polvo, concentrado de leche, queso para untar, aderezos o bebidas.
- 20 7. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 que comprende además una proteína y/o péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, un mineral y/o un oligoelemento.
- 25 8. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en la que la cepa está presente en una cantidad de más de 10^6 ufc por gramo de la formulación.
9. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, que además comprende un adyuvante y/o una entidad farmacológica.
- 30 10. Una composición liofilizada que comprende una cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9.
11. Un alimento que comprende una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10.
- 35 12. Un medicamento que comprende una cepa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10.
- 40 13. Una cápsula que comprende una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10, la cápsula puede estar adaptada para la liberación controlada en el tracto gastrointestinal.
- 45 14. Una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en la prevención o el tratamiento de la obesidad o el síndrome metabólico relacionado con la obesidad.
15. Una cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 o una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).

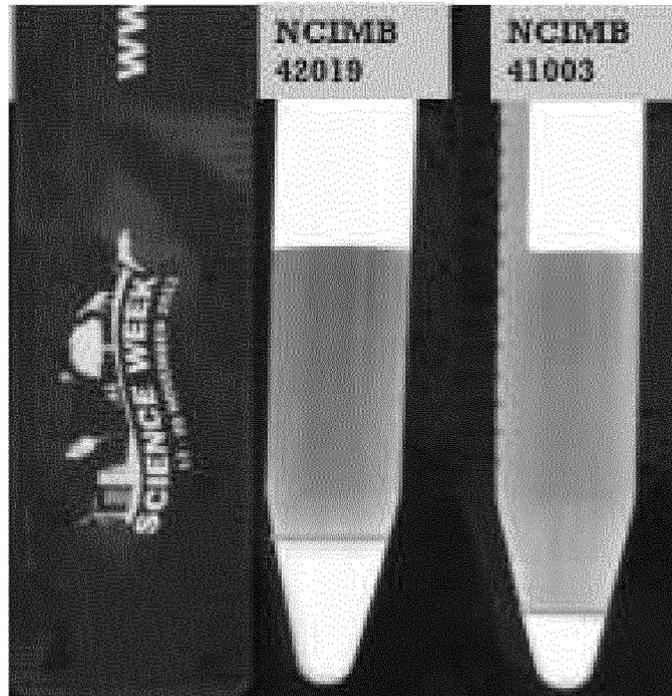


Fig. 1

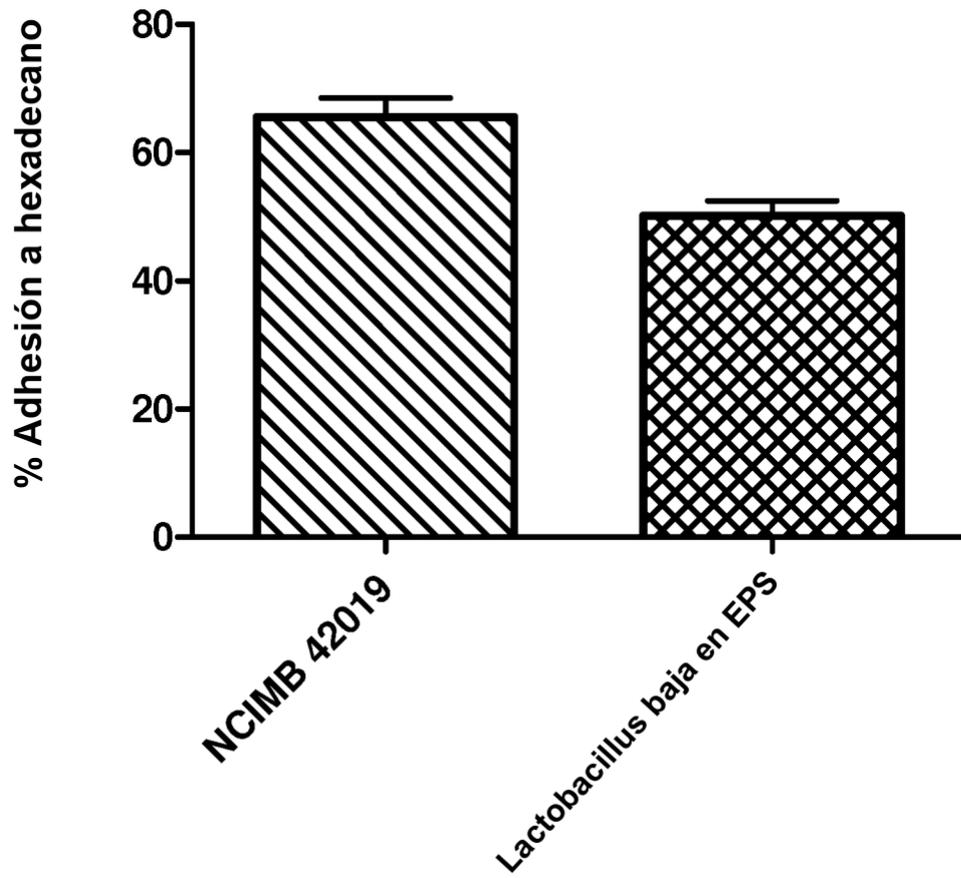


Fig. 2

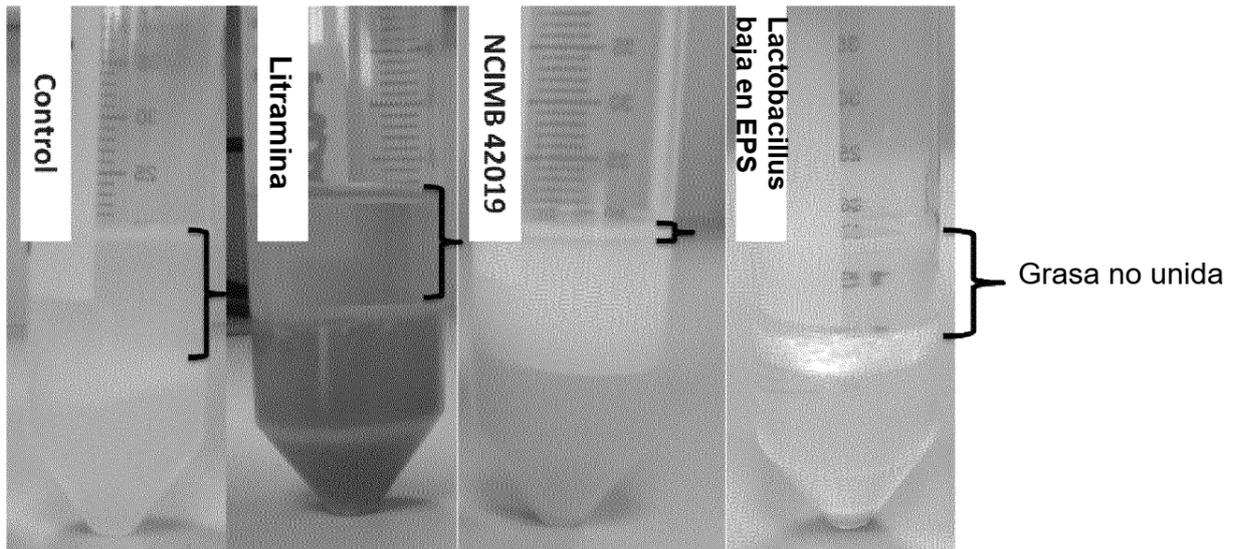


Fig. 3

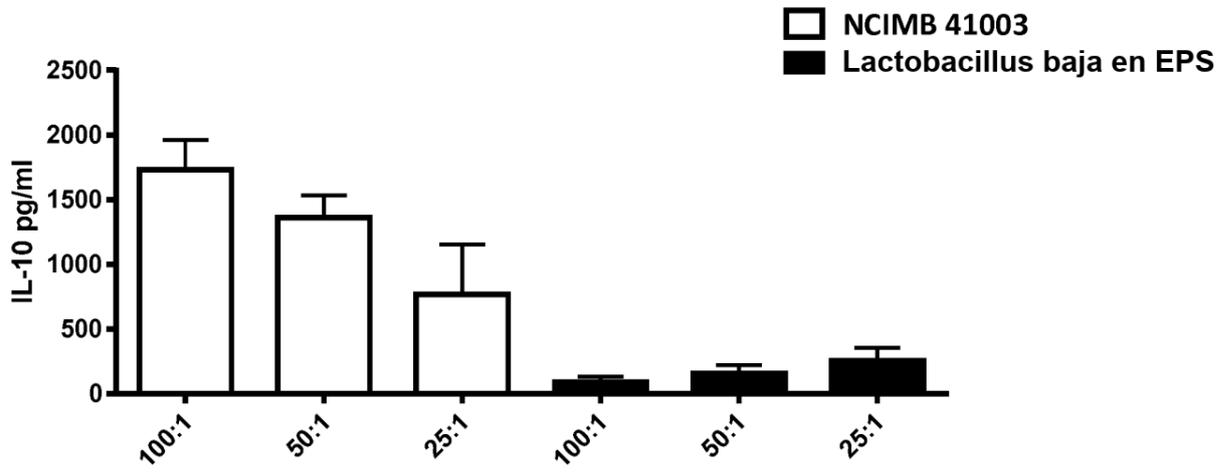


Fig. 4

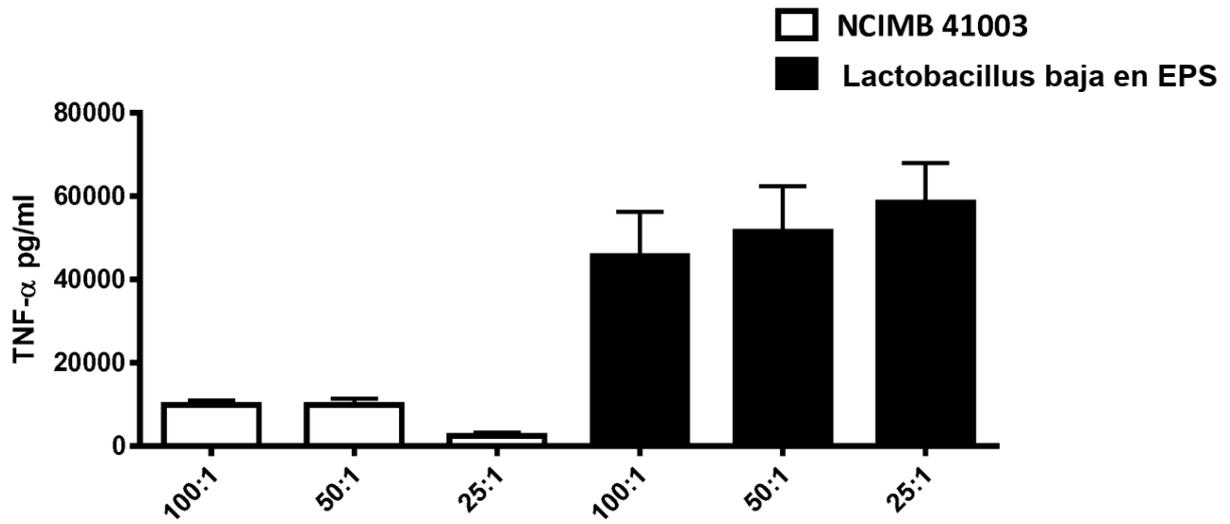


Fig. 5

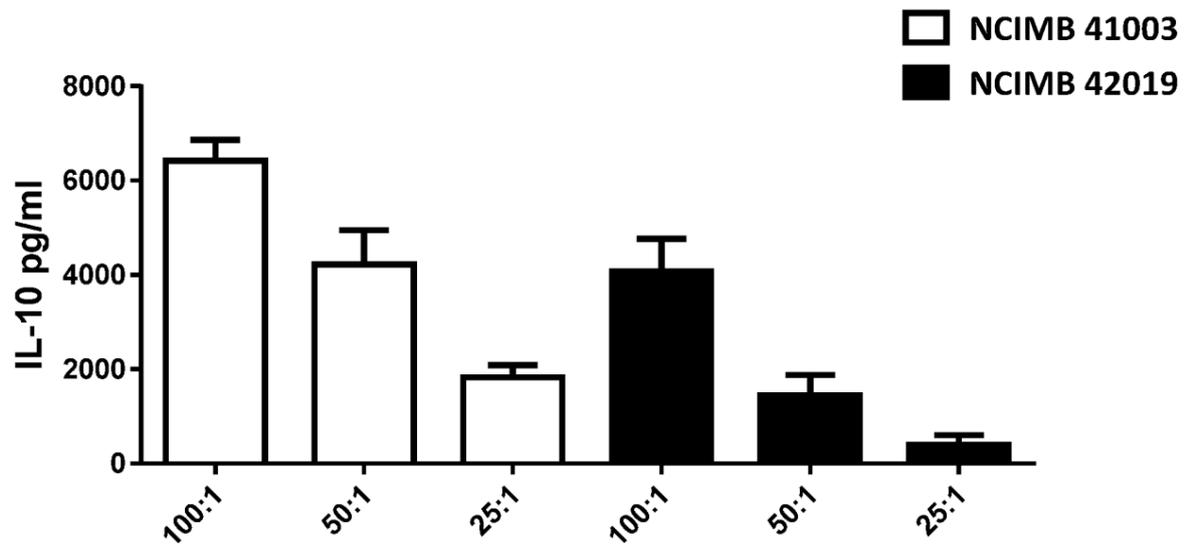


Fig. 6

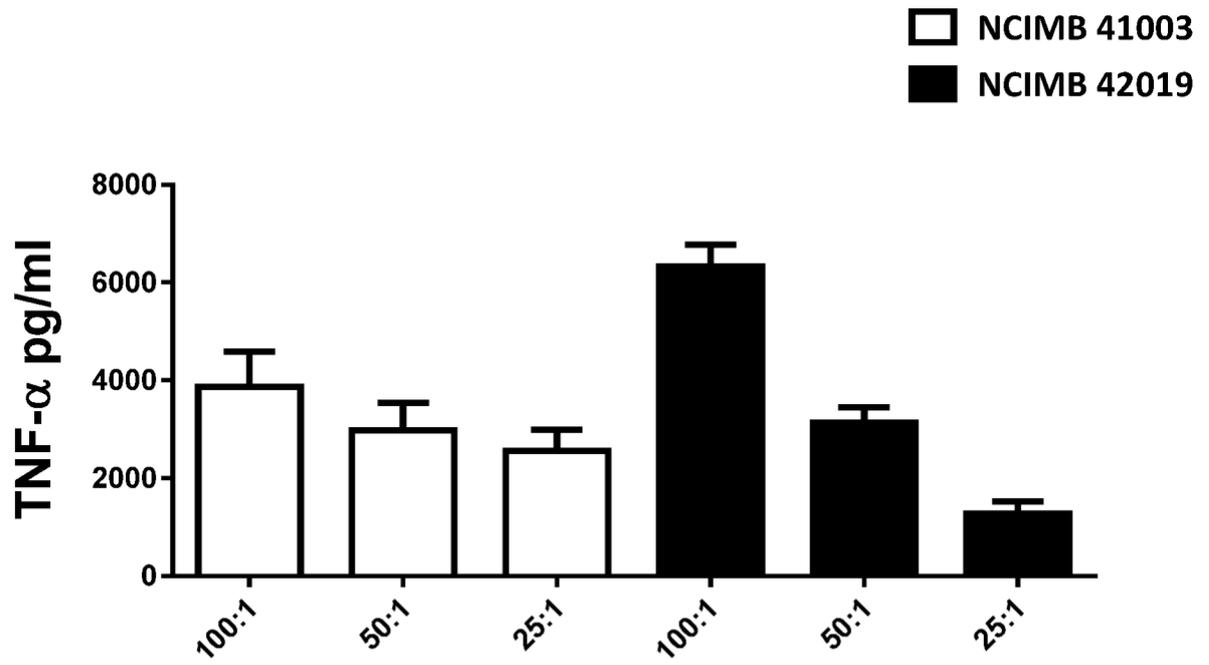
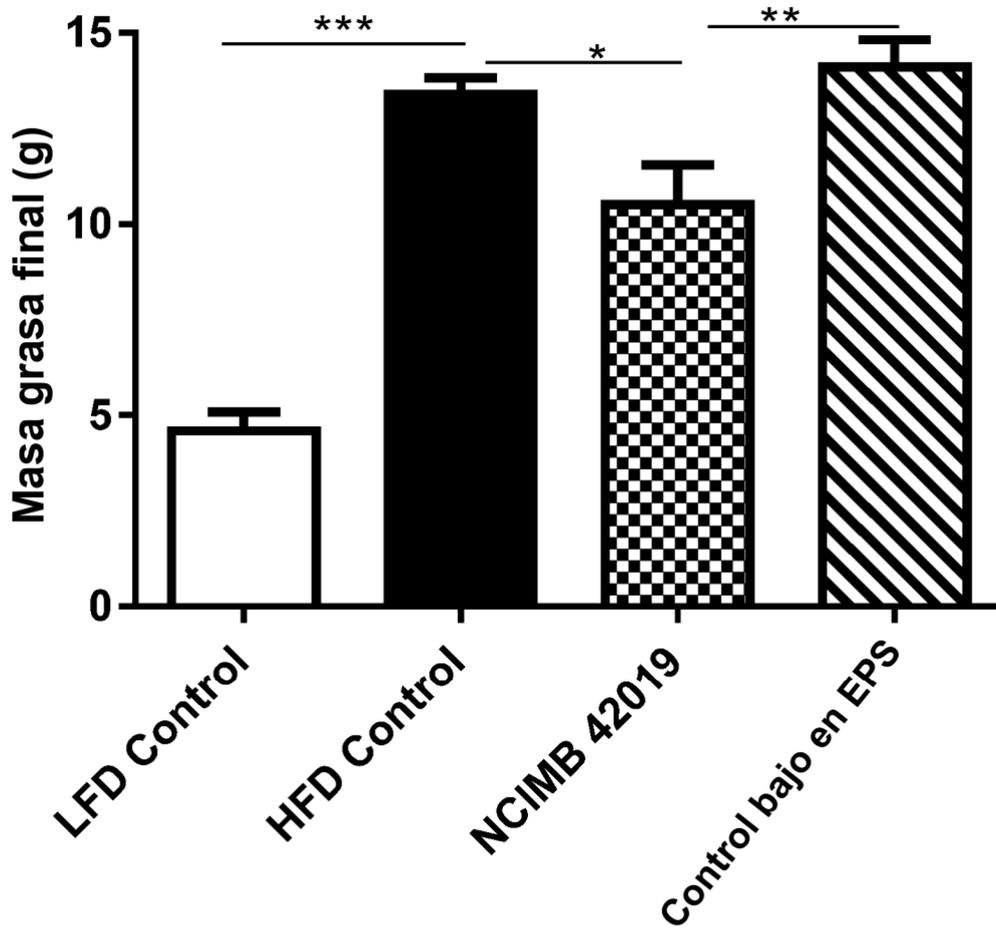


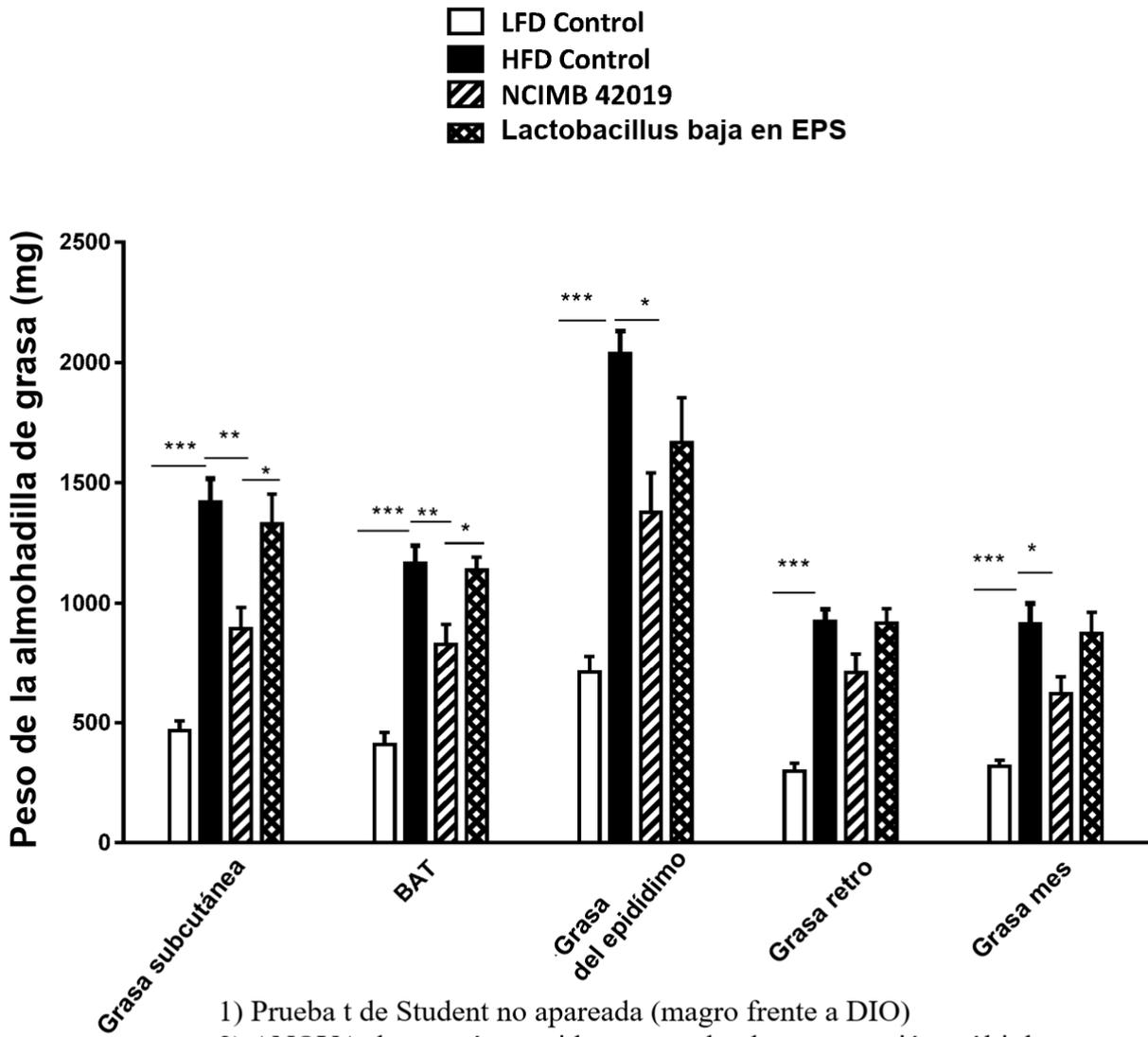
Fig. 7



- 1) Prueba t de Student no apareada (magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukeys (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

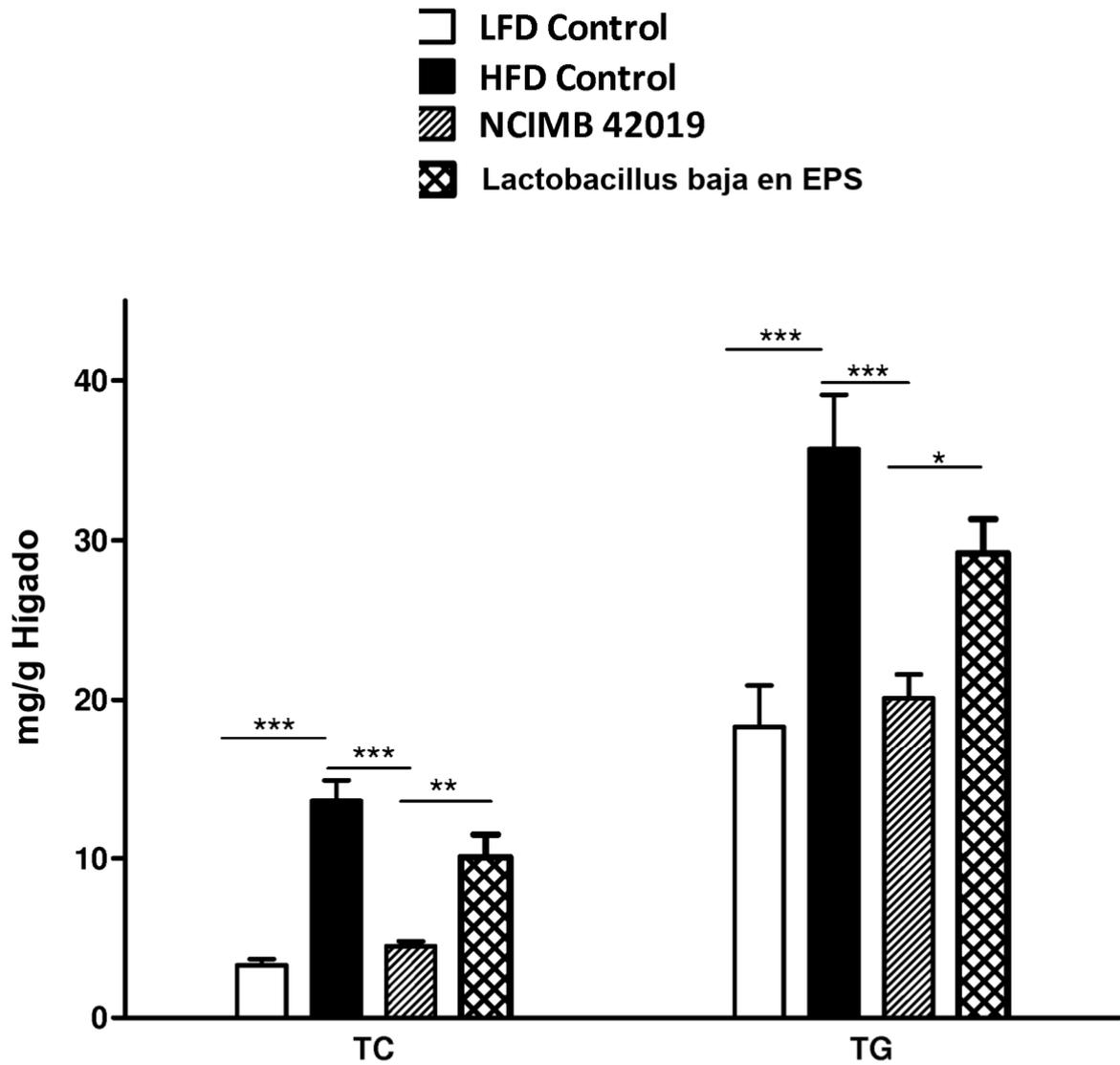
Fig. 8



- 1) Prueba t de Student no apareada (magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukeys (DIO frente a todas las cepas)

*** p<0,001. ** p<0,01, * p<0,05.

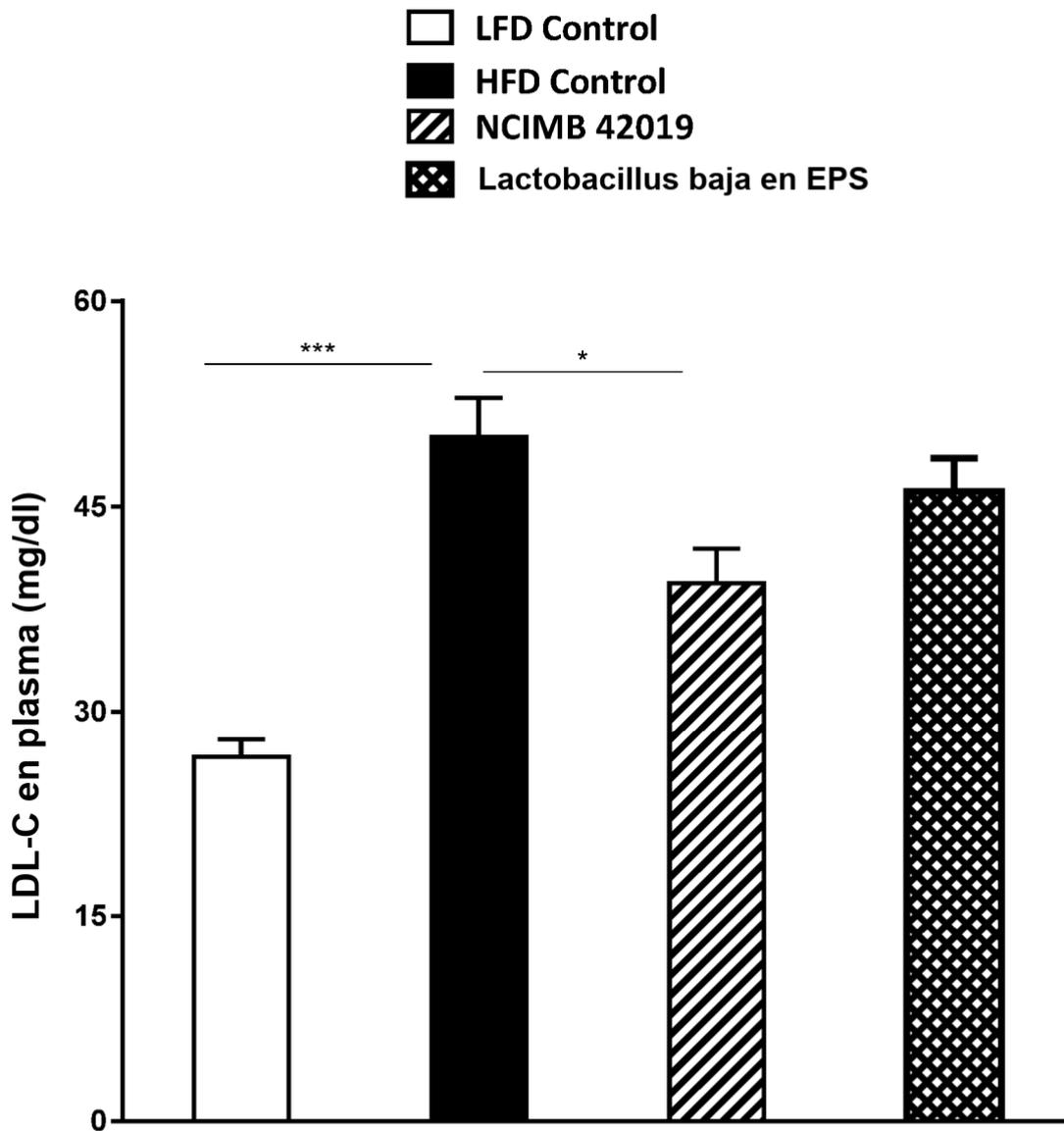
Fig. 9



- 1) Prueba t de Student no apareada (magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukeys (DIO frente a todas las cepas)

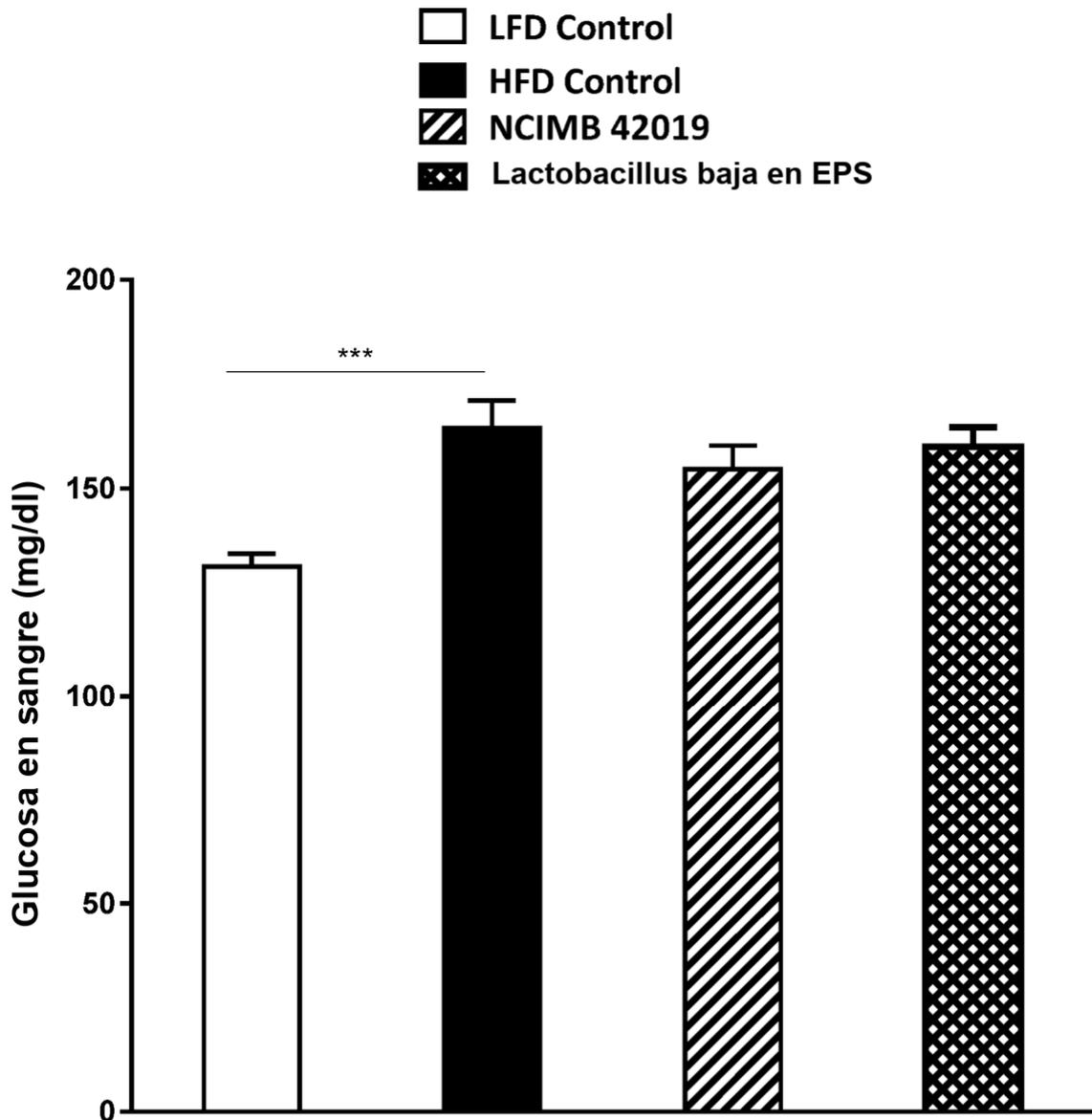
*** p<0,001. ** p<0,01, * p<0,05.

Fig. 10



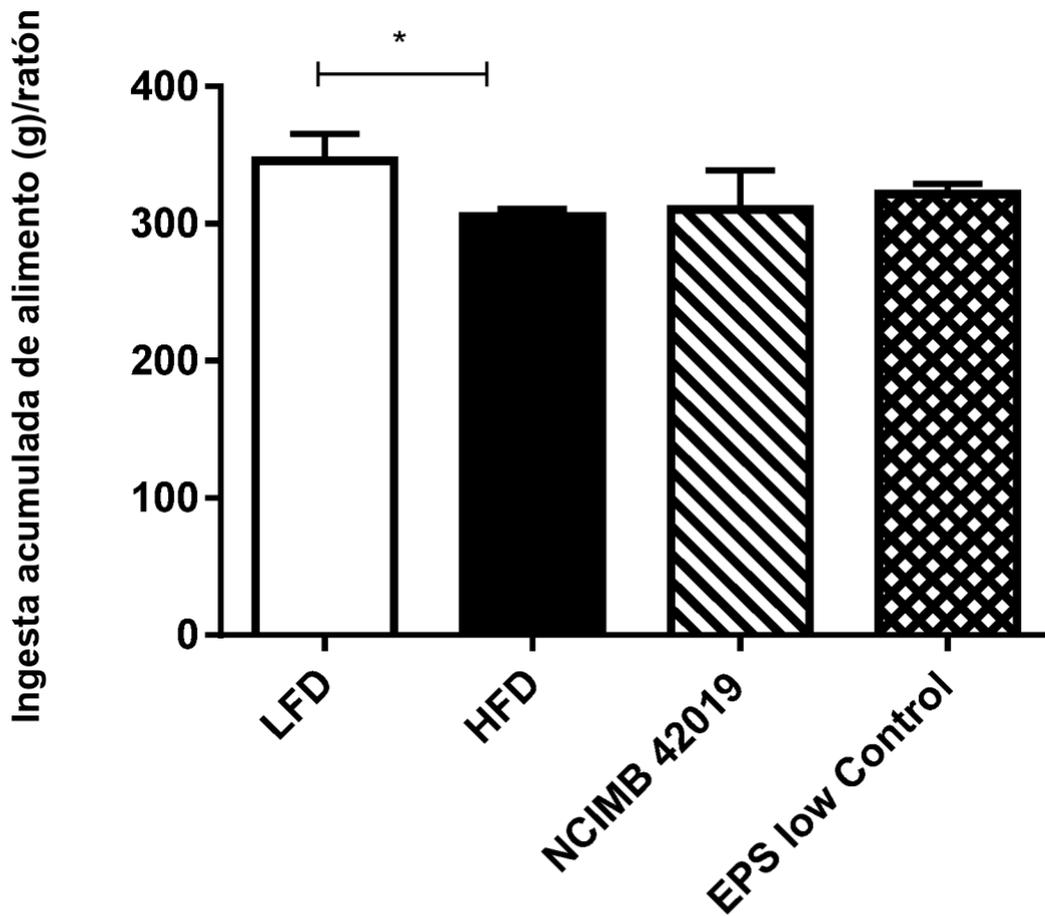
1) Prueba t de Student no apareada (magro frente a DIO)
2) ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukeys (DIO frente a todas las cepas)
*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Fig. 11



- 1) Prueba t de Student no apareada (magro frente a DIO)
 - 2) ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukeys (DIO frente a todas las cepas)
- *** p<0,001. ** p<0,01, * p<0,05.

Fig. 12



- 1) Prueba t de Student no apareada (magro frente a DIO)
 - 2) ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukeys (DIO frente a todas las cepas)
- *** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Fig. 13

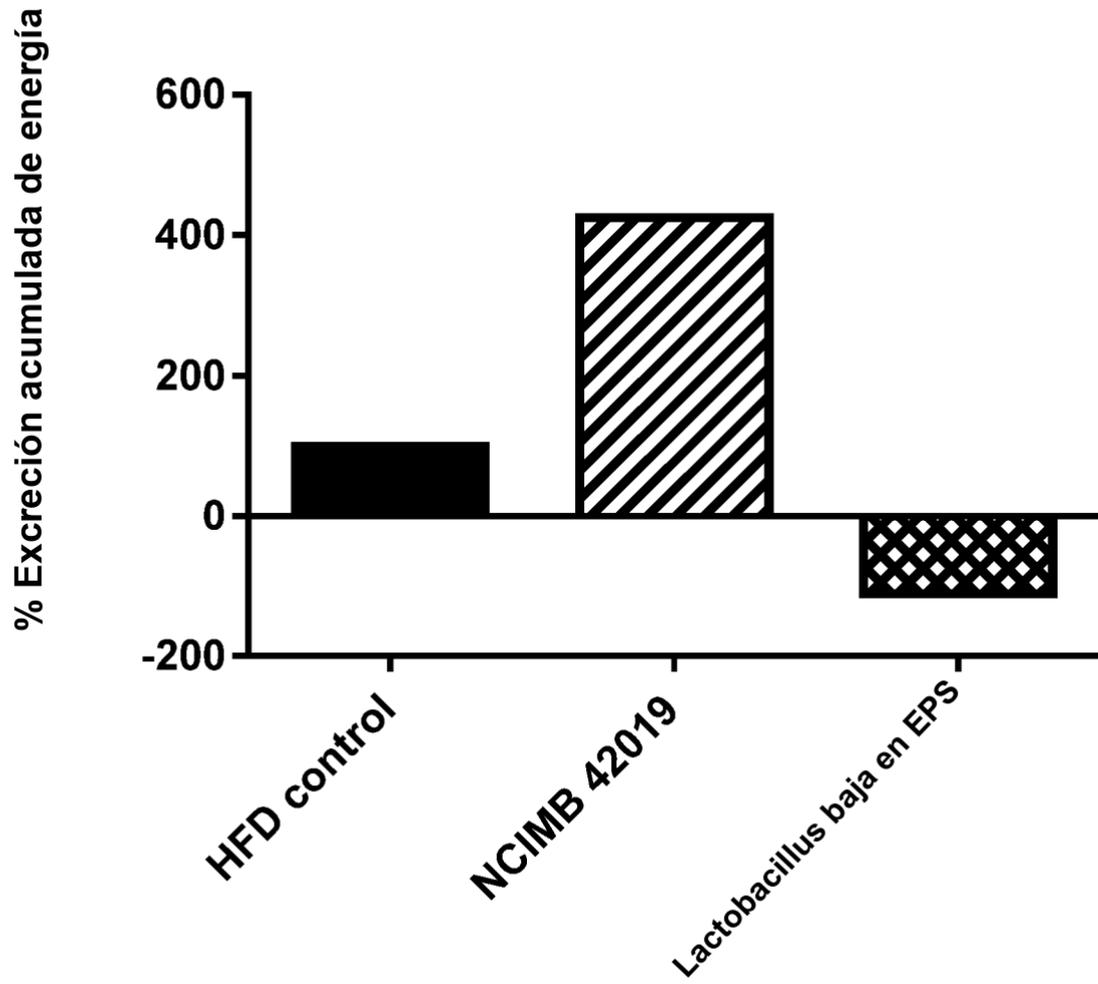


Fig. 14

(a)

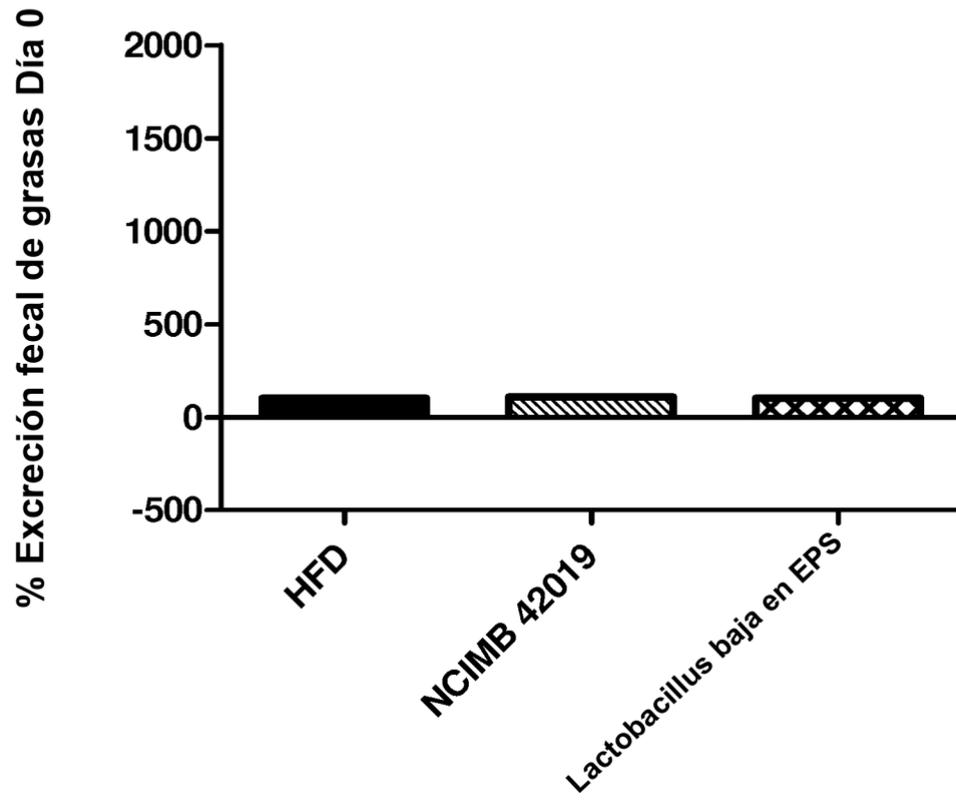


Fig. 15(a)

(b)

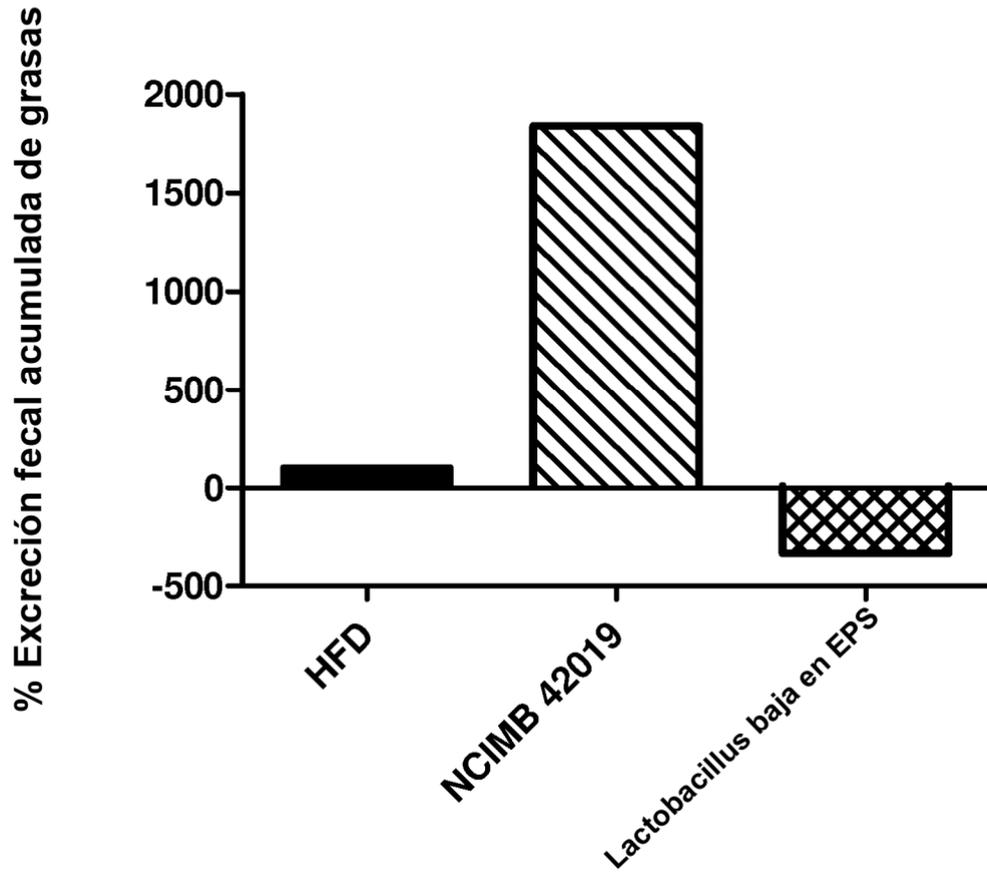


Fig. 15(b)

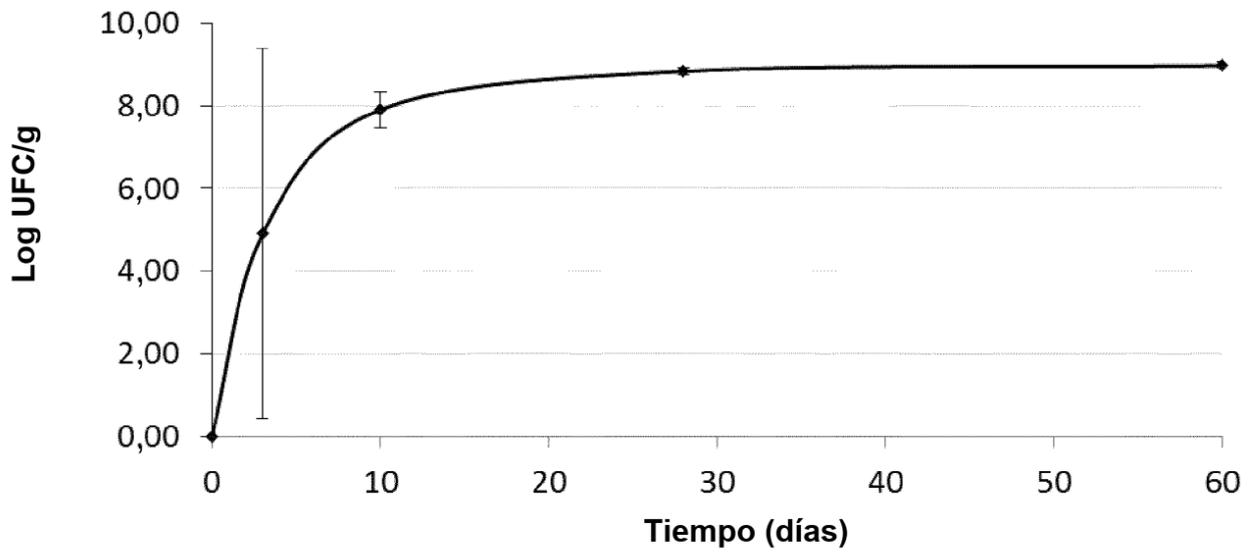


Fig. 16